

Aus dem Institut für Geflügelkrankheiten
der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. G. Monreal

Untersuchungen zur Differenzierung eines von Zwergpapageien isolierten Pockenvirus

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Veterinärmedizin
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Volker Kraft

Tierarzt aus Berlin

1971

Journal-Nr. 754

Aus dem Institut für Geflügelkrankheiten
der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. G. Monreal

Untersuchungen zur Differenzierung eines von Zwergpapageien isolierten Pockenvirus

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Veterinärmedizin
an der Freien Universität Berlin



vorgelegt von
Volker Kraft
Tierarzt aus Berlin

1971
Journal-Nr. 754

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

Vorsitzender: Prof. Dr. J. Boch
Referent: Prof. Dr. G. Monreal
Korreferent: Prof. Dr. E. Hellmann

Tag der Promotion: 13. Juli 1971



MEINEN LIEBEN ELTERN



Digitized by the Internet Archive
in 2026

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Einleitung	1
2. Literatur	3
2.1. Geschichtliches	3
2.2. Morphologie der Geflügelpocken- viren	4
2.3. Differenzierungs- und Züchtungs- methoden der Geflügelpockenviren	7
3. Material und Methoden	15
3.1. Virus	15
3.2. Eikulturen	15
3.3. Zellkulturen	16
3.4. Kulturmedien	17
3.5. Bestimmung der Infektiosität	18
3.6. Versuche zur Virusvermehrung in Zellkulturen	18
3.7. Neutralisationsteste	20
3.8. Agar-Gel-Präzipitationsteste	20
3.9. Antiseren	21
3.10. Äther- und Chloroformresistenzteste	21
3.11. Elektronenmikroskopische Unter- suchungen	22
3.12. Infektionsversuche	23

	Seite
4. Ergebnisse	24
4.1. Eigenschaften des Pockenvirus- stammes III/5 in der Eikultur	24
4.2. Vergleichende Untersuchungen in der Zellkultur mit dem Pockenvirusstamm AP III/5 und anderen Geflügelpocken- virusstämmen	28
a) Der cytopathogene Effekt (CPE)	28
b) Die Plaquebildung	31
4.3. Kinetik der Virusvermehrung des Pockenstammes AP III/5	38
4.4. Neutralisationsversuche	40
4.5. Präzipitationsversuche im Agar-Gel	42
4.6. Äther- und Chloroformresistenzteste	44
4.7. Elektronenmikroskopische Unter- suchung	45
4.8. Infektionsversuche	47
5. Besprechung der Ergebnisse	49
6. Zusammenfassung	59
7. Summary	61
8. Literaturverzeichnis	62

1. EINLEITUNG

Als Erreger der Pockenerkrankungen bei Vögeln können mehrere selbständige Pockenvirusarten nachgewiesen und differenziert werden (19, 22, 23, 33, 42). Neben den seit langem bekannten vier Vogelpockenviren, Hühnerpockenvirus (HP-Virus), Taubenpockenvirus (TP-Virus), Putenpockenvirus (PP-Virus) und Kanarienspockenvirus (KP-Virus), konnte MAYR (persönliche Mitteilung) unlängst auch bei Wachteln ein eigenständiges Pockenvirus nachweisen. Darüber hinaus kann aufgrund seines breiten Wirtsspektrums auch das Vacciniavirus besonders bei Küken und Jungputen eine schwere Pockenerkrankung auslösen (22, 42). Diese verschiedenen Pockenvirusarten findet man bei einer Reihe verschiedenster Vogelarten, u. a. auch bei Fasanen, Gänsen, Enten, Pfauen, Sperlingen, Wildtauben, Falken, Buchfinken, Ammern, Erlzeisigen, Hänflingen sowie bei Perl-, Wald- und Rebhühnern (20, 75).

Die Pockenerkrankungen bei den Vogelarten zeigen vielfältige Unterschiede im Krankheitsverlauf. Je nach Erreger, Tierart und Abwehrlage differenziert man zwischen einer lokalen Erkrankungsform, die nicht zu einer generalisierenden Virämie führt, einer generalisierten Form und einer septikämischen Form (16, 22).

Die generalisierte Form verläuft als zyklische Infektionskrankheit. Dabei gelangt das Virus von der Eintrittspforte nach Bildung der Primärpocke haematogen in das Retikulo-histiozytäre System(RHS). Nach dieser ersten Virämie vermehrt sich das Virus in den primär affinen Organen, besonders in der Leber und dem Knochenmark. Erreicht dort die Virusvermehrung ein bestimmtes Ausmaß, so kommt es zu einer zweiten Virämie und zur Ansiedlung des Virus in den Manifestationsorganen. Ausdruck einer stattgefundenen sekundären Virämie sind dann die Exantheme an den unbefiederten Partien des Kopfes, an

der Unterfläche der Flügel, in der Umgebung der Kloake, bzw. diphtheroide Beläge auf den Schleimhäuten der Atemwege (sogen. Pockendiphtheroid) (52, 53, 89).

Die septikämische Form kann sogar perakut verlaufen. Der Tod tritt bereits während der zweiten Virämie ein, so daß es zur Ausbildung der Sekundärpocken dabei meist nicht mehr kommt.

In einer vorläufigen Mitteilung berichteten KRAFT und TEUFEL (35) erstmalig über Pockenerkrankungen bei Zwergpapageien (*Agapornis personata* und *Agapornis roseicollis*). Auch hier konnte ein unterschiedlicher Krankheitsverlauf, Exantheme mit Restitutio, aber auch generalisierte Formen, die zum Tode führten, beobachtet werden. Unsere damaligen Untersuchungen ergaben keine eindeutige Zuordnung des aus erkrankten Agaporniden isolierten Pockenvirusstammes III/5 zu einem der bekannten Vogelpockenvirusstämme.

Aufgabe vorliegender Arbeit ist es, durch weitere Untersuchungen eine Charakterisierung und Differenzierung dieses Pockenvirusstammes herbeizuführen.

2. LITERATUR

2.1. Geschichtliches

Erste Berichte über pockenartige Erkrankungen des Geflügels finden sich schon in der Literatur des 18. Jahrhunderts (20). Man brachte die Krankheit einerseits mit den Diphtherieepidemien des Menschen in Zusammenhang (4, 16, 20, 74), andererseits vermutete man enge Beziehungen zu den menschlichen Pockenerkrankungen.

Eine Abgrenzung der Geflügelpocken zur Diphtherie des Menschen erfolgte durch PICARD (21), und 1863 bzw. 1873 kamen SPINOLA (4) und BOLLINGER (20) aufgrund von Übertragungsversuchen zu der Überzeugung, daß Menschen-, Säugetier- und Geflügelpocken nicht identisch sind.

MARX und STRICKER (4) gelang es 1902 durch Filtration durch Berkefeld-Filter die Virusätiologie der Vogelpocken nachzuweisen.

Seit der Entdeckung des Kanarienspockenvirus 1932 durch KIKUTH und GOLLUB (19, 33) differenzierte man bei den Geflügelpockenviren aufgrund klinischer, immunologischer und histologischer Eigenschaften (4) drei Virusarten: 1. Hühnerpockenvirus, 2. Taubenpockenvirus, 3. Kanarienspockenvirus.

1963 gelang es MAYR (42), durch neue Differenzierungsverfahren das Putenspockenvirus als viertes und 1971 ein Wachtelpockenvirus als fünftes originäres Vogelpockenvirus nachzuweisen (persönliche Mitteilung).

2.2. Morphologie der Geflügelpockenviren

Die Entdeckung der intrazytoplasmatischen Einschlusskörperchen in den Epithelien der Haut und Schleimhaut erkrankter Hühner durch RIVOLTA 1869 (20, 74) und deren Beschreibung von BOLLINGER 1873 veranlaßte zahlreiche Forscher, die Struktur dieser Gebilde zu untersuchen. So fanden 1906 BORREL, BURNET (8) und 1908 LIPSCHÜTZ (36) in den Bollingerschen Einschlusskörperchen kokkenartige Gebilde, die nach ihrem Entdecker als BORRELSche Körperchen bezeichnet wurden.

In den zwanziger und dreißiger Jahren bemühten sich viele Autoren, die Größe und Natur dieser Viruselementarteilchen mit Hilfe physikalischer und chemischer Methoden näher zu bestimmen. Es war jedoch der modernen Elektronenmikroskopie vorbehalten, nähere Einzelheiten der Feinstruktur der Pockenviren darzustellen.

Intensive elektronenmikroskopische Untersuchungen am Kanarienspockenvirus unternahmen u. a. HERZBERG, KLEINSCHMIDT und Mitarbeiter (24-28). An Hand von Tupfpräparaten und Ultradünnschnitten von Haut- und Muskelgewebe künstlich infizierter Kanarienvögel und durch Polyestereinbettung virusinfizierter Histiozyten entwarfen sie ein Bild der Kanarienspockenelementarteilchen, das auch als Modell für die übrigen Vogelpockenvirusarten angesehen werden kann (22). HERZBERG et al. unterscheiden im wesentlichen zwei Elementarteilchen-Formen, ovoide Frühformen von nur einer Kontur begrenzt, deren Inneres gleichmäßig hell und fast strukturlos ist, und reife Elementarteilchen mit zwei Konturen und einem hantelförmigen Innenkörper. Die Frühformen bilden in ihrer weiteren Entwicklung

einen dunklen Innenkörper aus. Nach neueren Untersuchungen von SIMPSON (83) erhalten sie dann eine äußere Doppelmembran durch Inkorporation in Mitochondrien. Die reifen Elementarkörperchen haben nach HERZBERG et al. eine ovale bis abgerundete Form. Ihre lange Achse mißt maximal 390 nm, minimal 220 nm, und die breite Achse ist maximal 240 nm, minimal 100 nm. Die innere Struktur der Pockenviruselementarkörperchen ist komplex und trotz zahlreicher elektronenmikroskopischer Untersuchungen (31) bisher nicht eindeutig geklärt. Die Wand der Körperchen besteht aus der oben erwähnten Doppelmembran. Es folgt dann eine Proteinschicht, die fädige Struktur aufweist. Diese Fäden bilden jedoch beim Vaccinia-virus und den Vogelpockenviren nicht die beim Orf-Virus von NAGINGTON et al. (57, 58) beobachtete schleifenförmige Anordnung. An der Längsseite des Virion finden sich zwei nach innen gerichtete Auftreibungen. Die Funktion dieser sogenannten Lateralkörper ist unbekannt. Eventuell beinhalten sie ein gemeinsames Gruppenantigen der Pockenviren (15). Es folgt eine weniger elektronendichte Zwischenschicht, die den Innenkörper umschließt (25, 26). Dieser Innenkörper ist an der Längsseite eingedellt und zeigt eine innere Lichtung. Durch Uranylacetatbehandlung wurde in dieser Lichtung eine Struktur sichtbar, die als Desoxyribonukleinsäure (DNS)-komponente gedeutet wird (26, 31). Weitere Untersuchungen über die Struktur der DNS-Komponente liegen von HYDE, GAFFORD und RANDALL (29) vor, denen es 1967 gelang, das Molekulargewicht der Hühnerpocken-DNS zu bestimmen. Mit 192×10^6 daltons ist es das größte bekannte Virusnukleinsäuremolekül.

In weiteren Untersuchungen an reifen Elementarkörperchen gelang es Herzberg et al. mit Hilfe der Negativkontrastierung mit Phosphorwolframsäure (negative staining) morphologische Unterschiede des Kanarienvogelpockenvirus zum Vacciniavirus darzustellen (27).

ARHELGER und RANDALL (1) verfolgten ultrahistologisch den Entwicklungszyklus des Hühnerpockenvirus in der Chorioallantoismembran (CAM), beginnend mit der Adsorption und Penetration bis zur Ausschleusung der reifen Partikel. Sie beobachteten, daß die phagozytoseartigen Prozesse der Viruseinschleusung, die Entstehung von Viroplasmazonen und der Einschlußkörperchen beim HP-V deutlich langsamer abläuft als es DALES und SIMINOVITCH (12) und NIELSEN und PETERS (59) beim Vacciniavirus beschreiben.

Bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen mit dem Taubenpockenvirus fanden MAYR und MAHNEL (49) in den Spätstadien der CAM-Infektion Virusabbauvorgänge. An der Zellperipherie sahen sie Ansammlungen reifer Viruselementarkörperchen, in deren Zentrum Degenerations- und Auflösungserscheinungen auftraten. Als Endprodukt dieser Vorgänge fanden sie körniges, zum Teil fädiges und stäbchenförmiges Material. Als Ursachen dieses Virusabbaues am Rande von Primärherden diskutieren die Autoren eine Interferonwirkung bzw. enzymatisch bedingte Abbauvorgänge.

Aufgrund der elektronenmikroskopischen Untersuchungen von SIMPSON (83) sind die Bollingerschen Einschlußkörperchen als transformierte lipoidhaltige Mitochondrien aufzufassen - wie bereits S. 5 erwähnt -, in deren Peripherie gehäuft reife Elementarkörperchen anzutreffen sind. Die Funktion der Einschlußkörperchen scheint es zu sein, unreife Frühformen mit ihrer Doppelmembran zu umhüllen und somit in die reife, "mature" Form zu überführen.

Durch ihren hohen Lipidgehalt färben sich die Einschlußkörperchen intensiv mit Fettfarbstoffen. In dieser Eigenschaft unterscheiden sich die Vogelpocken von den Säugerpocken, die dieses Verhalten nicht zeigen (22).

2.3. Differenzierungs- und Züchtungsmethoden der Geflügel-pockenviren.

Aufgrund ihrer morphologischen und immunologischen Eigenschaften werden die Pockenviren in Untergruppen eingeteilt. JOKLIK (30, 31) wertet als wichtigstes Kriterium einer Klassifizierung die Morphologie der Pockenviren und unterteilt in fünf Untergruppen: Vaccinia, Myxoma, Geflügelpocken, Paravaccinia und Unklassifizierte. Zur Vacciniauntergruppe gehören neben dem Vacciniavirus das Kuhpockenvirus, Kaninchenpockenvirus, Mäusepockenvirus (Ektromelievirus), Menschenpockenvirus (Variola) und Alastrimvirus. Zur zweiten Untergruppe zählt JOKLIK das Myxomvirus, das Fibromvirus, das Fibromvirus des Eichhörnchens und das des Kaninchens. Die Geflügelpocken unterteilen sich in die genannten Hühner-, Kanarien-, Puten- und Taubenpockenviren. Der Paravacciniagruppe werden zugerechnet das Molluscum contagiosum-Virus, das Virus der ansteckenden Pustulardermatitis (Orf-Virus), das Ziegenpocken- und Schafpockenvirus, das Lumpy skin-Virus, das Melkernknotenvirus (Pseudokuhpockenvirus) und das Virus der Stomatitis papulosa des Rindes. Zur Untergruppe der Unklassifizierten rechnet JOKLIK das Schweinepocken-, Fischpocken- und Affentumovirus. Eine ähnliche Gruppierung der Pockenvirusgruppe wurde 1970 auch von der Internationalen Nomenklaturkommission für Viren (I. C. N. V.) vorgeschlagen (86).

Die charakteristische äußere Form der Pockenviren gestattet weiterhin eine zusammenfassende Unterteilung in zwei Gruppen (30, 31). Zur ersten, auch als Vacciniatyp bezeichneten, gehören die Untergruppen Vaccinia, Myxoma und Vogelpocken. Ihre Größe schwankt zwischen 200 - 250 nm und 250 - 320 nm. Die zweite Gruppe umfaßt die kleineren Pockenviren (160 - 260 nm) aus der Paravacciniauntergruppe, die sich durch eine ovale Form und ein geordnetes schleifenförmiges Muster

auszeichnen, das in der Negativkontrastierung durch Überlagerung als Kreuzgitter erscheint (57, 58).

Mit der Züchtung des H-Pockenvirus auf der CAM des embryonierten Hühnereies, erstmals durch WOODRUFF und GOODPASTURE 1931 (92) erfolgreich durchgeführt, war ein Schritt zur Untersuchung der Vermehrung des Virus getan und ein wesentliches Kriterium in die Pockendiagnostik eingeführt. Weiterhin gelingt es, die Geflügelpockenviren im Versuchstier und in Zellkulturen zu züchten.

Für die Züchtung der Pockenviren stellt das embryonierte Hühnerei ein ideales Wirtssystem dar. In ihren Arbeiten zur Pathogenese der Hühnerpockeninfektion konnten MAYR und WITTMANN (52, 54, 89) exakt den Verlauf der Infektion verfolgen und an Hand klinischer, histologischer und virologischer Untersuchungen besonders die zyklische Virusvermehrung in den embryonalen und außerembryonalen Organen des bebrüteten Hühnereies aufzeigen.

Im Verhalten der Geflügelpockenviren in der Eikultur finden sich Unterschiede besonders hinsichtlich Inkubationszeit, Aufbau und Größe der Primärherde, Zeitpunkt und Ausmaß der Generalisierung, Absterberaten sowie Ringzonen- und Einschlußkörperchenbildung, die für die Differenzierung der Stämme wertvolle Hilfsmittel sind (22, 23, 42, 43, 53). In eingehenden Untersuchungen hat MAYR (42) das Verhalten der Geflügelpockenviren in der Eikultur beschrieben und charakterisiert. Eine sichere Differenzierung gelingt jedoch nur, wenn die Pockenvirusstämme in den ersten Eipassagen miteinander verglichen werden können. Durch Dauerpassagen im Hühnerembryo adaptiert sich das Virus an das Kultursystem und verliert seine spezifischen Eigenheiten in Bezug auf die Veränderungen der CAM.

Für das HP-Virus fand MAYR (42) im wesentlichen folgende Kriterien: Nach einer Inkubationszeit von 48-72 Stunden entwickelt sich bis zum 6. Tag p.i. ein ca. 5 mm breiter, kompakter Proliferationsherd, der i. d. R. von einer Ringzone umgeben ist. Zwischen dem 5. und 9. Tag p.i. kommt es zur Generalisierung. Dabei wird die gesamte CAM von flachen, kleinen Sekundärherden durchsetzt, um die sich ebenfalls Ringzonen bilden. Während der Generalisationsphase stirbt das Embryo ab.

Das Chorioallantoisbild beim P-Pockenvirus kommt den durch das H-Pockenvirus hervorgerufenen Veränderungen am nächsten. Es unterscheidet sich jedoch durch eine bessere Ringzonenbildung mit mehreren Trübungsringen und durch eine geringere Neigung zu Abschlüpfungen und Nekrosen an den oberen Proliferationsschichten der Herde. Die Absterberate der Embryonen im Verlauf der Generalisation ist niedriger als beim H-Pockenvirus.

Beim T-Pockenvirus fand MAYR fast nie eine Generalisierung auf der CAM ausgebildet. Nur in seltenen Fällen entwickelten sich zwischen dem 8. und 10. Tag p.i. 1 - 10 Sekundärherde. Die Primärpocken sind charakterisiert als stark proliferierte, bis mehrere Millimeter dicke, schwartige Herde, denen eine Nekrose fehlt. Der Embryo überlebt fast immer die Infektion.

Die Primärherde beim K-Pockenvirus sind etwas kleiner als beim T-Pockenvirus und mehr gelblich gefärbt. Durch seine starke Generalisierung im Hühnerembryo, die zur Ausbildung von hundert kleiner Proliferationsknötchen auf der CAM führt, unterscheidet sich jedoch das CAM-Bild des Kanarienvirus von dem aller anderen Geflügelpockenvirusstämmen.

Nachdem KÖHLER und SCHWÖBEL (34) 1956 Hühnerpockenvirus in Zellkulturen aus Hühnerembryofibroblasten nach der Methode von DULBECCO (14) vermehrt hatten, untersuchten MAYR und KALCHER (47) 1959 erstmals Tauben-, Kanarien- und Hühnerpockenvirusstämme vergleichend in der Zellkultur. Wie sich auch in ihren späteren Untersuchungen bestätigte (42), kommt es bei den Geflügelpockenstämmen zu spezifischen cytopathogenen Kulturveränderungen, die vollkommen anders als beispielsweise beim Vacciniavirus ausgebildet sind. Aber auch innerhalb der Geflügelpockenvirusstämme ergeben sich deutliche Unterschiede, die eine Charakterisierung der Stämme erlauben. Gemeinsame Merkmale der Vogelpockenviren sind eine relativ langsame Vermehrung in den Zellkulturen, weiterhin geht den cytolytischen Prozessen regelmäßig eine Phase der Zellabkugelung und Degeneration voraus (42, 47). Die langsame Vermehrung in Zellkulturen stellt ein erschwerendes Moment bei virologischen Untersuchungen dar.

Durch mehr als 300 Dauerpassagen gelang es MAYR und Mitarbeitern (46, 51) virulente Kanarien- und Hühnerpockenstämme stark an die Gewebekultur zu adaptieren, so daß die Kontagiosität vollständig verloren ging, die Stämme aber ihr immunisierendes Vermögen behielten.

Über die Kinetik der Virusvermehrung bei den Geflügelpockenviren liegen, nach der uns vorliegenden Literatur, keine vergleichenden Untersuchungen vor. GAFFORD et al. (18) und CHANG et al. (10) untersuchten den Vermehrungsverlauf bei Hühnerpockenviren und kommen zu ungefähr gleichen Ergebnissen. Nach GAFFORD und Mitarbeitern beträgt die Dauer der Eklipsphase 24-36 Stunden.

In der 36. -72. Stunde p.i. liegt die Phase der exponentiellen Vermehrung mit ihrem Maximum an neugebildetem Virus in der 72. - 96. Stunde und einem Titerabfall des zellgebundenem Virus ab der 120. Stunde p.i.. Ähnlich dem Vacciniavirus bleiben die Hühnerpockenviren zellgebunden, und aus der lebenden Zelle werden nur 1-5 % des neugebildeten Virus freigesetzt (84).

Mit Hilfe der Plaque-Technik, wie sie von DULBECCO 1952 (13) entwickelt wurde und durch MAYR und KALCHER (48) für die Geflügelpocken erstmals modifiziert Anwendung fand, gelingt es, das unterschiedliche Verhalten in der Plaquebildung der Vogel-pockenviren darzustellen. Neben Verschiedenheiten im Aufbau und der Größe findet man auch zeitliche Differenzen im Auftreten der Plaques. So konnten bei den Untersuchungen von MAYR (42) Hühner- und Putenpocken erst am 11. Tag p.i. ausgewertet werden im Gegensatz zu Vacciniavirusplaques, die schon am 5. Tag p.i. voll ausgebildet sind (42, 65, 66). Weiterhin verwendet man diese Technik zur Züchtung genetisch einheitlicher Stämme (Klon-Züchtung), zu Virustitrationen und besonders für Neutralisationsversuche (48). ASCH und GIFFORD (2) gelang es, die Plaquebildung bei den Hühnerpocken durch Chymotrypsinzusatz zu beschleunigen.

Aufgrund des unterschiedlichen Verhaltens im Versuchstier lassen sich weitere Kriterien für eine Differenzierung der Pockenviren ermitteln (40, 42, 44). MAYR (42) erarbeitete für die Geflügelpocken und das Vacciniavirus eine Analyse der Wirtsspektren durch Infektion von Eintagsküken, 12 Wochen alten Hühnern und Puten, Tauben, Enten, Kanarienvögeln und Kaninchen. Durch die verschiedenartige Applikationsart (kutan, intravenös, intracerebral, intramuskulär) ergibt sich für die einzelnen Virusstämme ein cha-

rakteristisches Verhalten im Versuchstier, das eine Differenzierung zuläßt.

Zur Unterscheidung von Hühner- und Taubenpockenvirus eignet sich am besten das Eintagsküken. Nach intravenöser (i. v.) Injektion von H-Pockenvirus erkranken die Küken stets generalisiert, während das T-Pockenvirus i. v. von den Tieren reaktionslos getragen wird.

Das Putenpockenvirus differenziert man durch intravenöse Infektion der Ente, denn nur dieser Virusstamm verursacht bei Enten eine generalisierte Erkrankung.

Für das Kanarienspockenvirus fand MAYR ebenfalls eine Besonderheit, um es von den übrigen Geflügelpockenstämmen abzutrennen. Die intramuskuläre (i. m.) Infektion von Kanarien mit homologen Pockenvirusstämmen führt bei den Tieren stets zu einer generalisierten Erkrankung, während alle anderen Pockenstämme bei dieser Infektionsart apathogen sind.

Das Vacciniavirus besitzt von allen Pockenvirusarten das breiteste Wirtsspektrum. Von den Geflügelpocken unterscheidet es sich durch seine gute Vermehrungsfähigkeit im Kaninchen, die den Vogelpockenviren fehlt.

Mit Hilfe des Agar-Diffusionsverfahrens nach OUCHTERLONY (60) gelingt es, beim Geflügel präzipitierende Antikörper im Serum pockenerkrankter Tiere nachzuweisen und diagnostisch zu verwenden (77, 78, 85, 87, 91). Im Gegensatz zu vielen anderen Virusarten ist die antigene Struktur bei den Pockenviren, zumindest inner-

halb der Gruppe der Geflügelpocken, noch nicht so weit untersucht, daß es möglich wäre, allein mit Hilfe eines serologischen Untersuchungsverfahrens eine Stammdifferenzierung durchzuführen. Bei der immunoelektrophoretischen Analyse vacciniavirusinfizierter CAM-Homogenate fanden RODRIGUEZ-BURGOS et al. (73) 17 lösliche antigene Komponenten, von denen zwei als lipidhaltige Proteine und eines als ein Glycoprotein vorläufig identifiziert werden konnten. Eine ähnliche antigene Komplexizität ist mit Hilfe der Ouchterlony-Agar-Diffusionstechnik beschrieben worden. So fanden UPPAL und NILAKANTAN (85) im Gel-Diffusions-Test mit HP-Immunserum gegen HP-Antigene zwei Präzipitationsbanden, während dasselbe HP-Immunserum gegen TP-, KP- und PP-Antigen gleichzeitig nur einen Präzipitationsstreifen ausbildete. Ähnliche Ergebnisse erzielte BAXENDALE (3), der bei der Präzipitation mit HP-Immunserum gegen HP-Antigen drei Präzipitationsbanden fand. Im gleichen Versuch bildeten sich gegen PP- und TP-Antigen jedoch nur zwei Banden.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen, daß neben gruppenspezifischen auch stammspezifische Antigene mit Hilfe geeigneter Immunseren in der Präzipitationsreaktion nachzuweisen sind.

Ähnliche serologische Beziehungen innerhalb der Geflügelpockengruppe gelten auch für die neutralisierenden Antikörper. UPPAL et al. (85) fanden eine stärkere Neutralisation bei Immunseren gegenüber dem homologen Pockenvirus, jedoch gleichzeitig eine - wenn auch geringere - Pockenherdreduktion mit heterologen Geflügelpockenstämmen. Mit Hilfe einer geeigneten Versuchsanordnung kann demnach auch die Neutralisationsreaktion zur Differenzierung von Pockenvirusstämmen herangezogen werden.

Gegenüber chemischen Einflüssen, insbesondere gegen Lösungsmittel, findet sich bei den Pockenviren ein ähnliches Verhalten. Mit Ausnahme des Myxomatosevirus zeigen sie einerseits eine relative Resistenz gegenüber Äthyläther, andererseits sind alle Pockenviren chloroformlabil (5, 6, 22).

Hinsichtlich der Thermoresistenz und Lagerfähigkeit bestehen jedoch Unterschiede zwischen den einzelnen Pockenvirusstämmen (41, 42).

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Virus

Als Ausgangsmaterial für die weiteren Untersuchungen diente die 3. Eipassage des aus Zwergpapageien isolierten Pockenvirusstammes (s. auch Lit. 35), der bei den Untersuchungen die Kurzbezeichnung AP (Agaporniden-Pocken) III/5 erhielt. Die stark veränderten Chorioallantoismembranen wurden mit dem Ultraturrax homogenisiert und mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) im Verhältnis 1 : 10 aufgeschwemmt. Nach Zentrifugation des Homogenats wurde der Überstand mit dem üblichen Antibiotikazusatz (Penicillin-Streptomycin) versehen und das Material bis zum Gebrauch bei -30°C eingefroren.

Zu vergleichenden Untersuchungen überließ uns Herr Prof. Dr. A. MAYR dankenswerterweise als Referenzstämme den Hühnerpockenstamm HP-1, den Putenpockenstamm PP-1, den Karienvirusstamm KP-1, den Taubenpockenstamm TP-1 und den Vacciniavirusstamm Ankara CVA.

3.2. Eikulturen

Für Passageversuche und zur Virusvermehrung dienten 10 Tage alte embryonierte SPF(Valo)-Eier. Die Beimpfung erfolgte auf die ungesenkte CAM. Die Impfdosis betrug immer 0,1 ml. Zur Virus-ernte wurden die noch lebenden Embryonen i. d. R. am 6. Tag p. i.

abgetötet und die spezifisch veränderten Eihäute entnommen.

Die fotografische Wiedergabe der infizierten Eihäute erfolgte mit Hilfe des Leitz-Reproduktionsgerätes "Reprovit II a".

3.3. Zellkulturen

Alle Versuche wurden in Primärkulturen aus embryonalen Hühnerfibroblasten durchgeführt. Die Embryonen aus 10-tägig vorbebrüteten SPF-Eiern wurden nach dem Entfernen der Augen und des Darms zweimal in 37°C warmer Earlescher Lösung gewaschen. Nach Zerkleinerung mit der Schere wurde nach Vor-trypsinierung (10 Min.) mit 0,25 %iger Trypsinlösung (PBS-T) auf dem Magnetrührer zwei- bis dreimal 30 Minuten trypsiniert und anschließend schonend zentrifugiert (5 Min. bei 600 UpM). Nach Filtration durch doppelt und 4-fache Gaze folgte erneut eine niedertourige Zentrifugation der Zellen, die dann wieder in Anzuchtmedium aufgenommen wurden.

Die Zählung der Zellen erfolgte in der Zählkammer nach Fuchs-Rosenthal nach Färbung mit Kristallviolett. Für die Kulturen in Röhrchen und Rouxschalen wurde die Zellzahl auf 800.000 pro ml eingestellt, während in die Petrischälchen (Greiner-Plastik, 6 cm Durchmesser) eine Million Zellen pro ml Medium gegeben wurden. Zur Anzucht brachten wir in die Röhrchen 1,5 ml, in die Schälchen 4,5 ml und in die Rouxschalen 80 ml der jeweiligen Zellsuspension.

Normalerweise war der Zellrasen nach 24 Stunden dicht angewachsen und konnte beimpft werden.

Die mikroskopischen Untersuchungen der cytopathogenen Veränderungen in den Zellkulturen wurden mit dem Leitz-Mikroskop "Orthoplan" bei einer Vergrößerung von $12,5 \times 4$ durchgeführt.

3.4. Kulturmedien

Medium 199 mit Phenolrot (Flow) wurde für die Anzucht $1,1\%$ ig angesetzt. Pro 100 ml Medium erfolgte ein Zusatz von 4,4 ml Natriumbicarbonat ($2,8\%$ ig), 12,5 ml Tryptosephosphatbouillon (Flow) und 5 ml Kälberserum. Nach der Sterilfiltration (Membranfilter-Satorius, $0,2\ \mu$ Porengröße) wurde durch CO_2 -Begasung der pH-Wert auf etwa 7,4 eingestellt.

Das Erhaltungsmedium hatte die gleiche Zusammensetzung, es enthielt jedoch nur 2% Kälberserum. Die Röhrchenkulturen wurden mit 2 ml, die Schälchen mit 5 ml und die Rouxschalen mit 100 ml beschickt.

Für Plaquekulturen und Neutralisationsversuche im Plaque-reduktionstest kam ein Earle-Lactalbumin ($1,25\%$ ig)-Medium zur Anwendung, dem $0,25\%$ Hefeextrakt (TC Yeastolate, Difco), $0,125\%$ Glutamin (L-Glutamin, Serva) und zu gleichen Teilen $1,5\%$ iger Agar (Difco) zugesetzt wurde. Die beimpften Kulturen wurden mit 5 ml dieses agarhaltigen Mediums überschichtet. Die Bebrütung der Schälchenkulturen erfolgte bei 37°C in einer 5% igen CO_2 -Atmosphäre. Die Pockenvirusstämme AP III/5, KP-1 und CVA wurden mit festem Overlay überschichtet und am 5. Tag p.i. mit Neutralrotlösung (Verd. 1:10 D.C.) gefärbt. Da die Plaques der Pockenstämme HP-1, PP-1 und TP-1 erst am 8. Tag p.i. zur

Auswertung gefärbt werden konnten, erwies es sich als notwendig, die Kulturen zusätzlich mit flüssigem Erhaltungsmedium (ohne Phenolrotzusatz) zu überschichten. Davon wurden am 3. und 5. Tag p.i. pro Schälchen 1,5 ml vorsichtig auf das feste, agarhaltige Medium pipettiert.

3.5. Bestimmung der Infektiosität

Für die Virustitrationen in der Eikultur wurden Homogenate pockenspezifisch-veränderter Chorioallantoismembranen in Zehnerpotenzen mit m/90 phosphatgepufferter Kochsalzlösung (pH-Wert = 7,2) verdünnt. Pro Verdünnungsstufe wurden mindestens 4 Eier mit jeweils 0,1 ml auf die ungesenkte CAM beimpft.

In Zellkulturen erfolgte die Titerbestimmung durch Infektion von Röhrchenkulturen. Das in Zehnerpotenzen verdünnte Virusmaterial wurde pro Verdünnungsstufe auf 4 Röhrchen verimpft. Die endgültige Auswertung fand je nach Virusstamm zwischen dem 5. und 8. Tag p.i. statt, wobei nur die Röhrchen positiv bewertet wurden, die mindestens eine für den entsprechenden Pockenvirusstamm typische cytopathische Veränderung im Zellrasen aufwiesen. Die Berechnung der EID_{50} und KID_{50} erfolgte nach der Methode REED und MUENCH (71). Die Titerangaben beziehen sich immer auf 1,0 ml.

3.6. Versuche zur Virusvermehrung in Zellkulturen

Mit dem Pockenvirusstamm III/5 wurden die in Petrischälchen zu einem geschlossenen Zellrasen ausgewachsenen primären Hühnerembryofibroblasten mit einer Multiplizität von ca. 20 plaque-

bildenden Einheiten (PBE) pro Zelle beimpft. Zur Adsorption des Virus wurden die Kulturen 90 Minuten in den Kühlschrank bei $+4^{\circ}\text{C}$ gestellt. Danach erfolgte eine zweimalige Waschung der infizierten Zellen mit angewärmter PBS. Nach Überschichtung mit 5 ml flüssigem Erhaltungsmedium wurde bei 37°C im CO_2 durchströmten Brutschrank bebrütet. Von der 6. bis 120. Stunde p.i. wurden durchschnittlich alle 8 Stunden zwei Schälchen zur Bestimmung des freien und des zellgebundenen Virus entnommen und weiterverarbeitet.

Das freigesetzte Virus wurde durch Absaugen des Mediums und zweimaliges Waschen des Zellrasens mit 2,5 ml angewärmter PBS gewonnen. Medium und Waschflüssigkeit wurden zentrifugiert und zusammen bei -30°C bis zur Titrierung eingefroren.

Zur Bestimmung des zellgebundenen Virus wurden auf den gewaschenen Zellrasen 2,5 ml steriles Aqua dest. pipettiert. Durch dreimaliges Einfrieren und Auftauen und rasches Pipettieren gelang es, den Zellrasen vollständig abzulösen und die Zellen aufzuschließen. (Vorversuche ergaben, daß durch den Einfluß dieser Behandlung eine Schädigung der Infektiosität des Virus nicht eintrat.) Nach Sedimentation der Zelltrümmer durch 10-minütige Zentrifugation bei 2500 UpM konnte aus dem Überstand der Virusgehalt bestimmt werden.

Die Berechnung der Titer erfolgte ebenfalls nach REED und MUENCH (71). Die gewonnenen Werte wurden für das freie Virus mit dem Faktor 2 multipliziert. Für das zellgebundene Virus beziehen sie sich auf die Aufschwemmung des Zellsedimentes in einem Volumen von 2,5 ml.

3.7. Neutralisationsteste

Die Neutralisationsversuche wurden nach der Serumverdünnungsmethode im Plaquereduktionstest durchgeführt. Die auf ca. 80 PBE eingestellten Virusstämme wurden 50 Minuten lang bei Zimmertemperatur mit den in Zweierpotenzen verdünnten und vorher inaktivierten (30 Min. bei 56°C) Seren inkubiert. Vor dem Beimpfen der Schälchenkulturen erfolgte eine einmalige Waschung des Zellrasens mit 37°C warmer PBS. Die Kulturen wurden mit 0,4 ml des Reaktionsgemisches beimpft und nach der oben beschriebenen Methode überschichtet, bebrütet und gefärbt.

3.8. Agar-Gel-Präzipitationsteste

Für die Präzipitationsteste wurde in dem Agarmedium die von WITTMANN (87) und WOERNLE (90, 91) angegebene Kochsalzkonzentration von 8 % verwendet. Bei chloroformgereinigten Seren wurde die von WOERNLE (90, 91) beschriebene Methode nach MANSI (38) gewählt und dem Agarmedium eine 10 %ige Phenollösung zugesetzt.

Die Herstellung des Mediums im einzelnen und die Auswertung der Präzipitationsteste erfolgte nach der von WOERNLE (90) beschriebenen Technik.

3.9. Antiseren

Für die Neutralisations- und Präzipitationsteste dienten neben den Immunseren, die uns freundlicherweise Herr Prof. Dr. A. MAYR zur Verfügung stellte, hauptsächlich selbst im Institut hergestellte Hühnenserren.

Zur Immunisierung wurden Eintagsküken mit 0,4 ml eines 1:10 verdünnten Eihauthomogenats mit einem Titer von etwa 10^6 EID₅₀/ml intravenös infiziert. In dreiwöchigen Abständen erhielten die Küken dann dreimal follikulär in beide Oberschenkel dasselbe Virusmaterial verabreicht. 14 Tage nach der letzten Infektion wurden die Tiere getötet, das Serum gewonnen und zum Gebrauch bei -30°C portioniert eingefroren.

3.10. Äther- und Chloroformresistenzteste

Der Chloroformresistenztest wurde nach der von MAYR und BÖGEL (45) beschriebenen Technik durchgeführt. Eine Virus-suspension des Pockenstammes III/5 mit einem Titer von etwa $10^{7,5}$ KID₅₀/ml wurde nach 10- und 20%igem Zusatz von Chloroformium pro analysi (Merck) eine Stunde lang bei +4°C in der Kühlzelle geschüttelt und anschließend über Nacht in den Kühlschranks gestellt. Nach kurzem Aufschütteln erfolgte bei 3000 UpM eine 60-minütige Zentrifugation ebenfalls bei +4°C. Aus der oberen wässrigen Phase wurde das Virus abpipettiert und der Titer in Röhrchenkulturen bestimmt. Zur Kontrolle wurde die gleiche Virussuspension ohne Chloroformzusatz derselben Behandlung unterzogen.

Zur Bestimmung der Ätherresistenz wurden Virussuspensionen aus der 3. Gewebekulturpassage der Pockenstämme AP III/5, HP-1, KP-1 und CVA mit 10, 20, 30, 40 und 50 % Äthyläther pro analysi (Merck) versetzt. Anschließend wurden die Proben eine Stunde bei $+4^{\circ}\text{C}$ und 2-3 Schüttelphasen pro Sekunde geschüttelt und ca. 18 Stunden in Ruhe im Kühlschrank ($+4^{\circ}\text{C}$) belassen. Nach kurzem Aufschütteln erfolgte dann eine einstündige Zentrifugation bei 3000 UpM und $+4^{\circ}\text{C}$. Das Virus wurde aus der untersten wässrigen Phase vorsichtig mit einer langen Kanüle abgesogen und der in dieser Phase noch verbliebene Äther durch Einleiten gereinigten Stickstoffgases entfernt. Auch in diesen Versuchen unterlag zur Kontrolle für jeden Virusstamm ein Röhrchen mit der entsprechend gleichen Virussuspension ohne Ätherzusatz der beschriebenen Behandlung. Die Rücktitrierung des Virusgehaltes erfolgte in Zellkulturen in der oben angeführten Methodik.

3.11. Elektronenmikroskopische Untersuchungen^{x)}

Die ungesenkte CAM 10 Tage alter embryonierter SPF-Eier wurde mit dem Isolat III/5 beimpft. In verschiedenen Stadien der Infektion schnitten wir aus pockenartig veränderten Herden der CAM Blöckchen heraus, von denen Dünnschnitte im Elektronenmikroskop beobachtet wurden.

^{x)} Die Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Professor Dr. S. GRUND, Leiter der Abteilung für Elektronenmikroskopie des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin, durchgeführt, dem ich an dieser Stelle dafür sehr herzlich danken möchte.

Direkt nach Entnahme der CAM aus noch lebenden Embryonen erfolgte die Fixierung mit 2,5 %iger Glutardialdehyd-Lösung in 0,1 m Phosphatpuffer für 2 Std. und eine dreimalige Waschung in der gleichen Pufferlösung. Es schloß sich eine Chromosmiumsäure-fixierung für 1 Std. sowie eine Nachfixierung in 1 %iger Uranyl-acetatlösung an.

Entwässert wurden die Präparate in einer von 70 % über 90 % auf 100 % ansteigenden Reihe von Äthylenglykolmonomethyläther (Cellosolve) für je 30 Minuten. Über Mischungen von Cellosolve: Styrol (1:1) für die Vestopal-Einbettung und Cellosolve:Methacrylat für die Benzenmethacrylat-Einbettung erfolgte die Überführung in Vestopal + Katalysator + Initiator sowie Butyl-Methylmethacrylat im Mischungsverhältnis 8:2 + 1 % Benzoylperoxyd und 3 % Divinylbenzen mit anschließender Polymerisation in Gelatine kapseln bei 30°C. Die am Ultratome I (LKB) und OmU2 (Reichert) hergestellten und auf mit Kohleträgerfolien befilmten Netzblenden übertragenen Dünnschnitte wurden mit Bleicitrat und Uranylacetat nachkontrastiert. Die Beobachtung erfolgte mit einem Elmiskop I (Siemens) bei 60 KV und einer Objektivaperturblennde von 30 μ , wobei zur Aufnahme Guilleminot-Platten verwendet wurden.

3.12. Infektionsversuche

Zur Ermittlung eines Wirtsspektrums wurden Zwergpapageien (*Agapornis personata*), Eintagsküken, 12 Wochen alte Hühner und Puten, Tauben, Kanarienvögel, Wellensittiche, 8 Wochen alte Enten sowie Kaninchen mit dem isolierten Pockenvirusstamm III/5 infiziert. Über weitere methodische Einzelheiten bezüglich Applikationsart des Isolates und Größe der verwendeten Tiergruppen wurde bereits berichtet (35).

4. ERGEBNISSE

4.1. Eigenschaften des Pockenvirusstammes III/5 in der Eikultur

Der Infektionsverlauf im Hühnerembryo nach Beimpfung der CAM mit dem Stamm AP III/5 wurde über 30 Eipassagen beobachtet. Innerhalb dieser Eipassagen erfuhr der Charakter der Herdbildungen eine auffällige Wandlung. Bis zur 7. Eipassage entwickelten sich nach einer Inkubationszeit von 40 - 60 Stunden bis zum 6. Tag p.i. 0,5 bis 1,2 cm große, stark proliferierte und gelblich-weiße Primärherde. Bei etwa der Hälfte der infizierten Embryonen waren ab dem 4. Tag p.i. Generalisationsherde auf der CAM ausgebildet. Die Größe der Sekundärherde schwankte zwischen 1 und 3 mm. Sie fanden sich vornehmlich entlang der Gefäße und traten ähnlich den Primärherden als proliferative und deutlich von der Umgebung abgesetzte Knötchen in Erscheinung. Bis zum 6. und 7. Tag p.i. überlebten die Embryonen regelmäßig die Infektion. Mit zunehmender Adaptation an das Kultursystem änderte sich jedoch das CAM-Bild. Das Virus generalisierte zu 100 % im Embryo, und um die Sekundärherde bildeten sich häufig deutliche Ringzonen (Abb. 1). Die Primär- und Sekundärherde waren weniger stark proliferiert, und in der Mitte der Herde fanden sich Abschliferungsprozesse und oberflächliche Nekrosen. 50 bis 70 % der Embryonen starben während der Generalisationsphase zwischen dem 3. und 5. Tag p.i. ab.

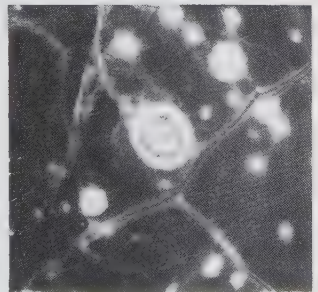
Für vergleichende Untersuchungen wurden die Geflügelpockenstämmen HP-1, PP-1, TP-1, KP-1 und der Vacciniavirusstamm

Ankara (CVA) angezüchtet. Klare Unterschiede der CAM-Veränderungen traten bei einem Vergleich zwischen dem Stamm III/5 und TP-1 sowie CVA auf. Der Taubenpockenvirusstamm unterschied sich von den übrigen untersuchten Pockenviren insbesondere durch seine geringe bzw. völlig fehlende Generalisierungstendenz im Hühnerembryo (Abb. 3).

Auch das Vacciniavirus war eindeutig von den übrigen Pockenstämmen zu differenzieren (Abb. 4). Besonders charakteristisch bei der Vacciniainfektion waren die nach kurzer Bebrütungszeit (ca. 20 Std. p.i.) ausgebildeten flachen und wenig proliferierten Primärherde mit ausgeprägter zentraler Nekrose. Die sehr zahlreichen Sekundärherde zeigten im Vergleich zu den Geflügelpockenvirusstämmen nur geringe Proliferationen und hatten eine zentrale Nekrose. Der Embryo starb während der Generalisierung regelmäßig ab.

Wie bereits oben beschrieben wurde, traten im Verlauf der Eipassagen bei dem aus Zwergpapageien isolierten Pockenvirusstamm Unterschiede auf. In den früheren Eipassagen (bis etwa 7. Eip.) fanden sich im CAM-Bild des Isolats III/5 Ähnlichkeiten mit dem angezüchteten Kanarienvirusstamm KP-1, besonders im Hinblick auf die stark proliferierten Primär- und Sekundärherde. In den höheren Eipassagen (Abb. 2) aber glich

Abb. 1. Starke Ringzonenbildung auf der CAM nach Infektion mit dem Pockenvirusstamm AP III/5, 23. Eipassage, 10. Tag p.i.



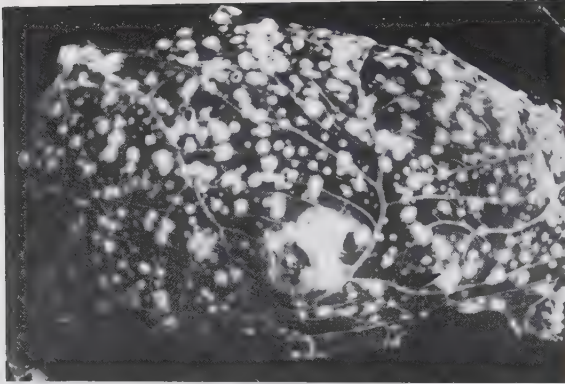


Abb. 2. Herdbildung auf der CAM bei AP III/5, 14. Eipass., 6. Tg. p.i.

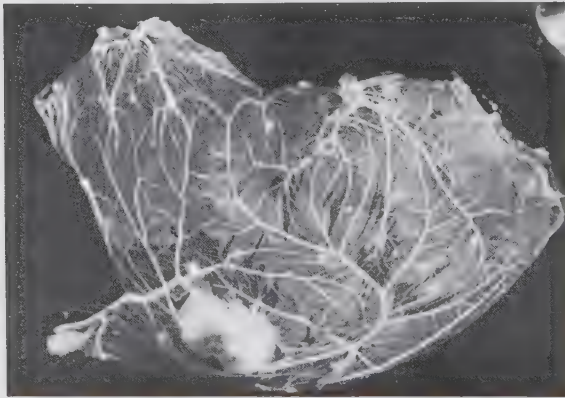


Abb. 3. Herdbildg. auf der CAM bei TP-1, 2. Berliner Eip., 6. Tg. p.i.

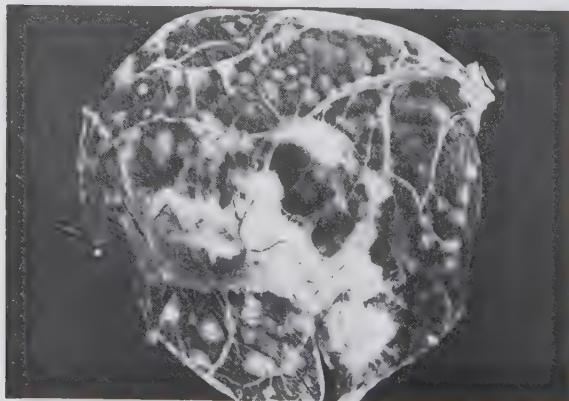


Abb. 4. Herdbildg. auf der CAM bei CVA, 2. Berliner Eip., 4. Tg. p.i.

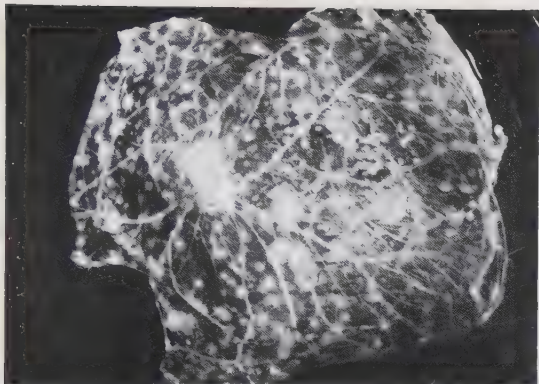


Abb. 5. Herdbildg. auf der CAM bei HP-1, 2. Berliner Eip., 6. Tg. p. i.

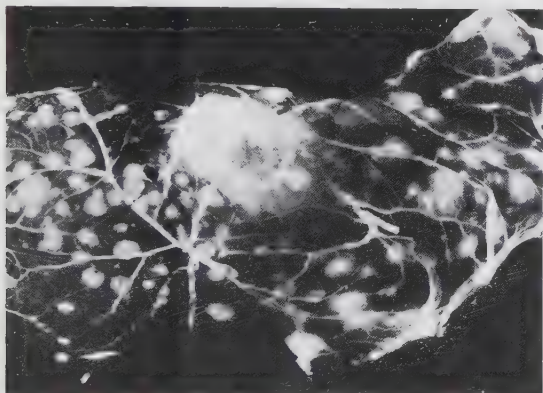


Abb. 6. Herdbildg. auf der CAM bei PP-1, 2. Berliner Eip., 6. Tg. p. i.

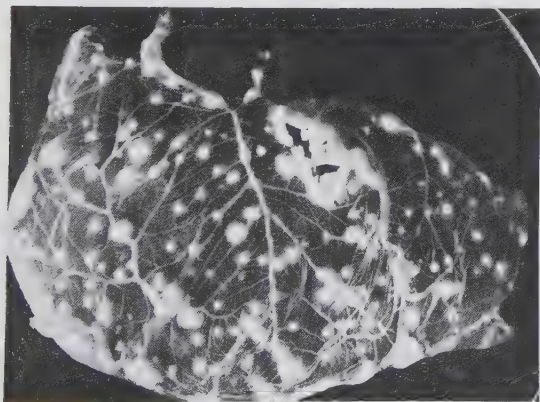


Abb. 7. Herdbildg. auf der CAM bei KP-1, 2. Berliner Eip., 6. Tg. p. i.

das CAM-Bild des Stammes AP III/5 mehr und mehr den durch das HP- bzw. PP-Virus (Abb. 5 u. 6) hervorgerufenen Veränderungen, die sich u. a. durch oberflächliche Nekrosen und Abschilferungen in den Spätstadien der Infektion und durch ihre Ringzonenbildung auszeichneten.

Da sich jedoch durch häufige Eipassagen die charakteristischen Eigenschaften der Pockenvirusstämme in der Eikultur verlieren (42, 52), stehen im ganzen gesehen die CAM-Veränderungen des Isolats III/5 in den ersten Eipassagen denen durch den Kanarienspockenstamm (Abb. 7) verursachten Herdbildungen am nächsten.

4.2. Vergleichende Untersuchungen in der Zellkultur mit dem Pockenvirusstamm AP III/5 und anderen Geflügelpockenvirusstämmen

a) Der cytopathogene Effekt (CPE)

Die Eigenschaften der Geflügelpockenvirusstämme HP-1, TP-1, PP-1, KP-1 und CVA wurden vergleichend mit dem Stamm AP III/5 in Primärkulturen aus embryonalen Hühnerfibroblasten untersucht. Die bei der Virusvermehrung auftretenden cytopathogenen Veränderungen im Zellrasen sind für die einzelnen Geflügelpockenvirusstämme spezifisch und gestatten eine Differenzierung voneinander (42, 47).

Bereits in der ersten Passage vermehrte sich der isolierte Pockenvirusstamm stark in der Zellkultur. Der Virusgehalt aus der Anzuchtpassage lag bei $10^5 \text{ KID}_{50}/\text{ml}$. Im Verlauf der weite-

ren Passagen stieg der Virustiter auf durchschnittlich $10^{6,5}$ KID₅₀/ml. Da der zeitliche Verlauf der Kulturveränderungen auch in Abhängigkeit von der Inokulationsdosis steht, wurde bei den vergleichenden Untersuchungen der Virusgehalt der einzelnen Stämme auf 10^4 KID₅₀/ml eingestellt. Alle Pockenvirusstämme stammten aus der zweiten Zellkulturpassage, um eine mögliche unterschiedliche Adaptation an das verwendete Zellkultursystem auszuschließen.

Der Pockenvirusstamm AP III/5 war insbesondere charakterisiert durch seine rasche Vermehrung in der Zellkultur (Abb. 8). Die cytopathogenen Veränderungen traten ebenso früh wie beim Vaccinia- und beim Kanarienspocken-Virus in Erscheinung (Abb. 9 u. 10). Im morphologischen Bild der Zellveränderungen fanden sich jedoch mehr Ähnlichkeiten mit den durch HP-, PP- und TP-Virus hervorgerufenen - allerdings später auftretenden - Zelldegenerationen (Abb. 11-13). Bei einer Infektionsdosis von 10^4 KID₅₀/ml konnten schon 16 bis 20 Stunden nach der Infektion beginnende Zellabkugelungen beobachtet werden. Besonders in den dünneren Bezirken des Zellrasens zeigten sich herdförmige Bezirke abgekugelter Zellen, die sich deutlich von den unveränderten Nachbarzellen abgrenzten. Während dieser Abkugelungsphase blieb der Zellverband noch erhalten. Erste lytische Herdchen ließen sich 40 Stunden p.i. erkennen. Zellabkuglung und -zerfall erfaßten im weiteren Verlauf der Infektion den gesamten Zellrasen, und am 3. Tag p.i. waren etwa 90 % der Zellen abgekugelt und etwa 40 % zerstört. Am 4. und 5. Tag der Infektion fanden sich nur noch abgekugelte Zellen in den bis zu 90 % zerstörten Kulturen. Die noch an den Kulturgefäßen anhaftenden Zellen überspannten schließlich wie ein weitmaschiges Netz den Boden der Gefäße.

Ähnlichkeiten im Zellbild und im zeitlichen Ablauf der cytopathogenen Veränderungen ließen sich lediglich beim Taubenpockenvirus beobachten (Abb. 13). Bei gleicher Infektionsdosis traten 48 Stunden p.i. kleine Herde abgekugelter Zellen in Erscheinung. Am 3. Infektionstag waren zahlreiche lytische Bezirke entstanden. Das weniger virulente Verhalten dieses Stammes dokumentierte sich neben der um etwa 6-8 Stunden verzögerten Inkubationszeit, einer nicht so schnell verlaufenden Zellabkugelungsphase insbesondere dadurch, daß die Kulturen erst am 6. Tag nach der Infektion ein ähnliches Zerfallsbild zeigten, wie es sich beim Agapornispockenvirus schon am 4. und 5. Tag p.i. entwickelt hatte.

Beim Hühner- und Putenpockenvirus traten die cytopathogenen Veränderungen am spätesten auf (Abb. 11 u. 12). Erst nach längerer Abkugelungsphase kam es zur Ausbildung cytolytischer Prozesse. Morphologische Unterschiede im Zerfallsbild dieser beiden Stämme waren nicht zu beobachten. Lediglich im zeitlichen Verlauf der Kulturveränderungen gab es geringe Differenzen. Beim Hühnerpockenvirus hatten sich am 3. Infektionstag erst wenige kleine Herde abgekugelter Zellen entwickelt (Abb. 11). Zur gleichen Zeit waren beim Putenpockenvirus schon größere Zellbezirke abgekugelt, und in deren Zentren fanden sich kleine lytische Zerfallszonen (Abb. 12). Bei der gewählten Infektionsdosis waren bei beiden Stämmen die Kulturen erst zwischen dem 7. und 8. Tag p.i. vollständig zerstört.

Die durch das Kanarienspockenvirus hervorgerufenen cytopathogenen Veränderungen sind innerhalb der Geflügelpocken-
gruppe so spezifisch, daß sie als ein wichtiges diagnostisches

Hilfsmittel für eine Stammdifferenzierung anzusehen sind. Während man im zeitlichen Verlauf der Zellveränderungen, die durch die Pockenvirusstämme AP III/5, HP-1, PP-1 und TP-1 hervorgerufen wurden, deutlich eine Abkugelungsphase von einer Phase der Lysis unterscheiden konnte, war der durch das KP-1-Virus induzierte CPE charakterisiert durch ein gleichzeitiges Einsetzen von Lysis, Abkugelung und scholligem Zellzerfall (Abb. 10). Dieser Prozeß begann schon 24 Stunden nach der Infektion, und am 4. bis 5. Tag p.i. waren die Zellen vollständig zu einem sandartigen Detritus zerfallen.

Ebenso rasch und vollständig wie beim Kanarienspockenvirus verlief der CPE beim Vacciniavirus, so daß in den Spätstadien der Infektion, etwa am 3. Tag p.i., beide Stämme in der Zellkultur nicht mehr zu differenzieren waren (Abb. 9). Charakteristisch beim CPE des Vacciniavirus war die geringere Tendenz der Zellen zur Abkugelung.

b) Die Plaquebildung

Da bei der Verwendung verschiedenartiger Nährmedien für die Zellkulturen besonders zeitliche Unterschiede im Auftreten von cytopathogenen Veränderungen im Hinblick auf die Angaben in der Literatur zu erwarten sind (42, 48), erschien es auch bei diesen Untersuchungen notwendig, die bekannten Geflügelpockenstämme vergleichend in unserem Kultursystem mit anzuzüchten. Zunächst wurde in Vorversuchen der Zeitpunkt der optimalen Plaqueauswertung bestimmt. Dabei stellte sich heraus, daß die Agapornis-, Kanarien- und Vacciniaplaques am 5. Tag p.i. optimal ausgebildet waren. Dagegen konnten die Hühner-, Puten-

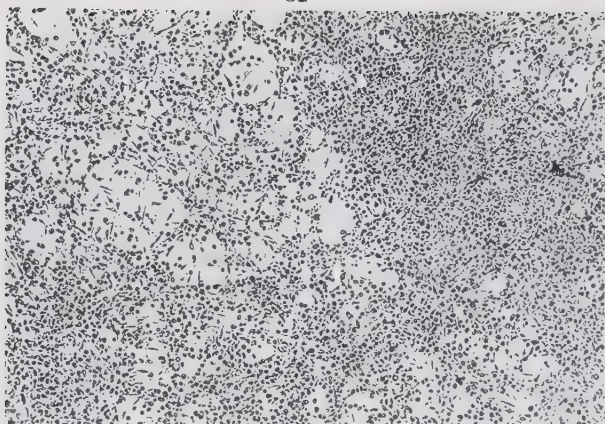


Abb. 8. CPE beim Pockenvirusstamm AP III/5, 3. Tg. p.i.

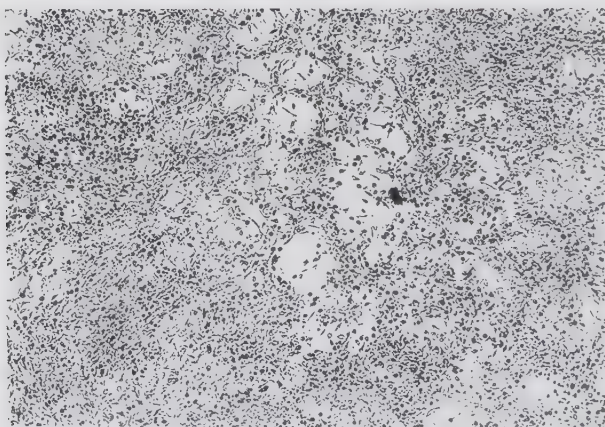


Abb. 9. CPE beim Vacciniavirusstamm CVA, 3. Tg. p.i.

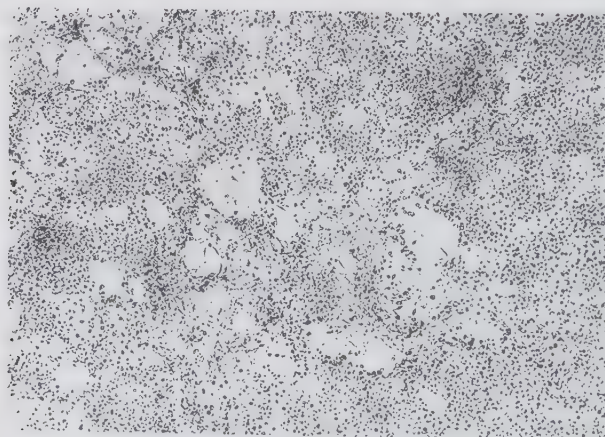


Abb. 10. CPE beim Kanarienvirusstamm KP-1, 3. Tg. p.i.

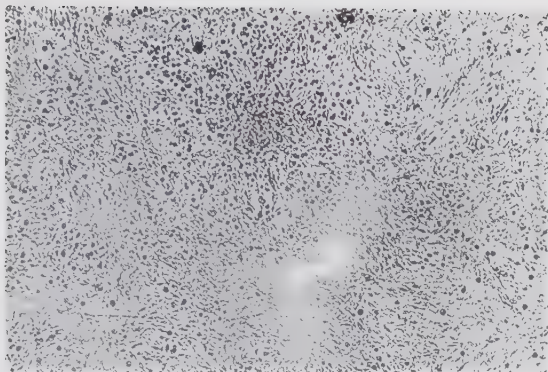


Abb. 11. CPE beim Hühnerpockenstamm HP-1, 3. Tg. p.i.



Abb. 12. CPE beim Putenpockenstamm PP-1, 3. Tg. p.i.

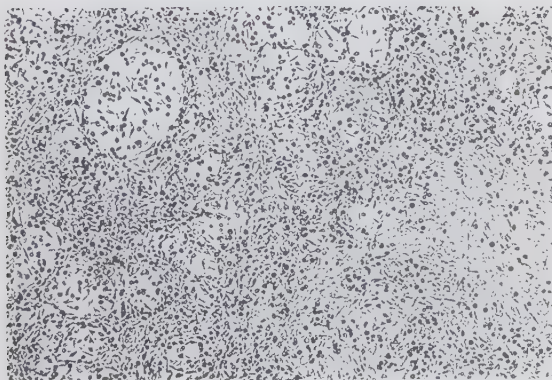


Abb. 13. CPE beim Taubenpockenstamm TP-1, 3. Tg. p.i.

und Taubenpockenplaques erst am 8. Tag p.i. gefärbt und ausgewertet werden. Weiterhin ergab sich aus den Vorversuchen, daß bei 8-tägiger Bebrütung zur besseren Nährstoffversorgung der Zellen am 3. und 6. Bebrütungstage das agarhaltige Nährmedium noch zusätzlich mit einem flüssigen Erhaltungsmedium überschichtet werden mußte (s. auch Lit. 48).

Die durch den Pockenvirusstamm III/5 hervorgerufenen Plaques unterschieden sich in ihrem zeitlichen Auftreten, ihrer Größe und in ihrem Aufbau eindeutig von den bisher bei Geflügelpocken bekannten Formen. Bereits am 5. Tag p.i. fanden sich 5-8 mm große runde Plaques, die ringartig von einer Zone abgekugelter Zellen eingefasst waren und sich dadurch scharf von dem nichtinfizierten Zellrasen abhoben (Abb. 14 u. 15). Zu diesem Zeitpunkt waren die Zellen im Inneren der Plaques degeneriert und abgekugelt, jedoch noch soweit erhalten, daß bei der Färbung noch Neutralrotlösung aufgenommen wurde.

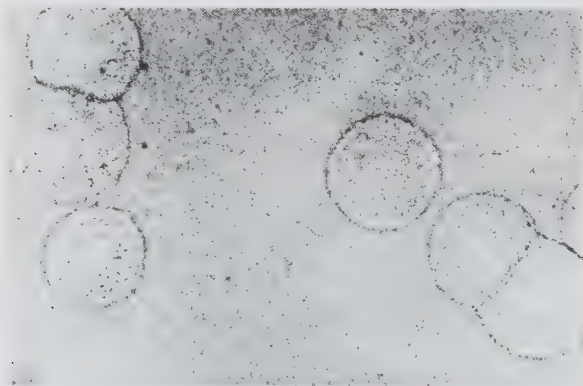


Abb. 14. Plaque-Bildung beim Pockenvirusstamm AP III/5, 5. Tag p.i.

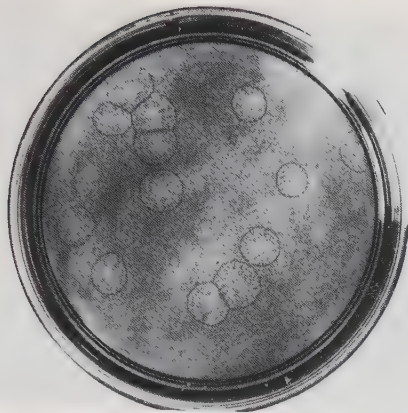


Abb. 15. Plaque-Bildung beim Pockenvirusstamm AP III/5,5. Tg. p. i.

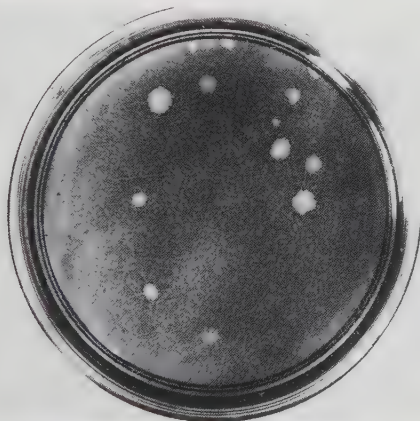


Abb. 16. Plaque-Bildung beim Kanarienvirusstamm KP-1,5. Tg. p. i.

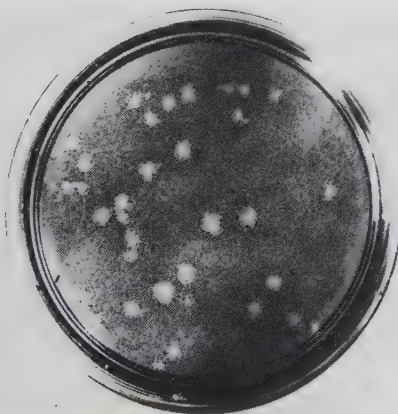


Abb. 17. Plaque-Bildung beim Vacciniavirusstamm CVA,5. Tg. p. i.

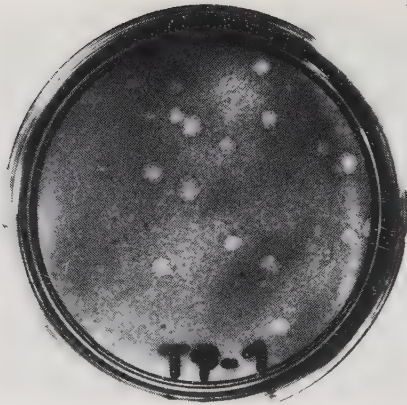


Abb. 18. Plaque-Bildung beim Taubenpockenstamm TP-1, 8. Tg. p. i.

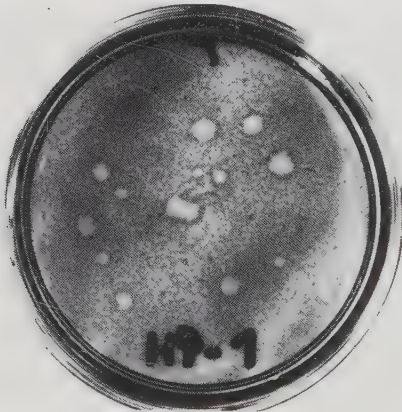


Abb. 19. Plaque-Bildung beim Hühnerpockenstamm HP-1, 8. Tg. p. i.

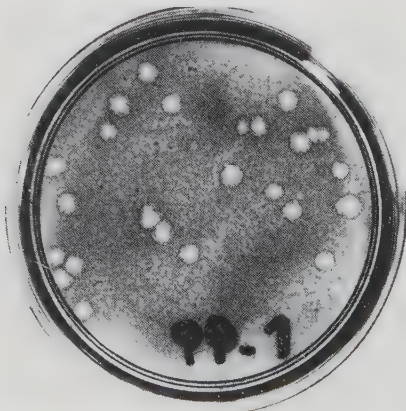


Abb. 20. Plaque-Bildung beim Putenpockenstamm PP-1, 8. Tg. p. i.

Die Kanarienspockenplaques (Abb. 16) hatten am 5. Tag p.i. einen Durchmesser von 2-4 mm. Durch die fast vollständige Zerstörung der Zellen im Innern der Herde, traten die Zentren der Plaques als ungefärbte Löcher hervor.

Die etwa gleichgroßen Plaques beim Vacciniavirus ließen durch unterschiedlich stark angefärbte Zellbezirke eine Ringzonenbildung erkennen (Abb. 17). Von der Umgebung waren sie durch eine schmale und unregelmäßig verlaufende Zone abgekugelter Zellen abgesetzt.

Am 8. Tag p.i. stellten sich die Taubenspockenplaques als 2-4 mm große Herde im Zellrasen dar (Abb. 18). Ähnlich wie bei den Vacciniaplaques trat auch hier eine Ringzonenbildung auf.

Die Hüherspockenplaques erreichten am 8. Tag p.i. einen Durchmesser von etwa 3-6 mm. Der innere Aufbau der Plaques variierte etwas bei den einzelnen Untersuchungen, besonders hinsichtlich der Ausbildung von Ringzonen. Die HP-Plaques in der Abb. 19 zeichnen sich durch einen fließenden Übergang von stark degenerierten Zellen des Zentrums zu den vorwiegend abgekugelten Zellabschnitten in der Peripherie aus.

Die Putenspockenplaques unterschieden sich von den Hüherspockenplaques hauptsächlich durch ihre etwas geringere Größe (Abb. 20) und eine schärfere Abgrenzung beim Übergang in nichtinfizierte Zellbezirke.

4.3. Kinetik der Virusvermehrung des Pockenstammes AP III/5

Die bisher beschriebenen Untersuchungen des Stammes AP III/5 in Hühnerembryofibroblastenkulturen (HEF) zeigten, daß sich dieses Virus durch eine für die Geflügelpockenviren sehr rasche Vermehrungstendenz auszeichnet. Die folgenden Experimente sollten über die Kinetik der Vermehrung nähere Einblicke vermitteln, besonders hinsichtlich eines Vergleichs mit den entsprechenden Untersuchungen von GAFFORD et al. (18) am Hühnerpockenvirus.

Der Verlauf der Vermehrung des Pockenvirus AP III/5 in HEF ist in Abb. 21 dargestellt.

Es gelang in der Versuchsanordnung mit einer Animpfdosis von $10^{7,5}$ KID₅₀ pro Schälchen, d. h. also einer Multiplizität von 20 (Infektiöse Einheiten/Zelle) und nach einer Adsorptionszeit von 90 Minuten bei $+4^{\circ}\text{C}$, die Bedingungen für eine Einzyklusvermehrung zu erfüllen.

Nach einer Eklipsphase von etwa 20 Stunden konnte von diesem Zeitpunkt an die exponentielle Vermehrungsphase verfolgt werden, die zu einem Maximum an zellgebundenem Virus etwa 40-44 Std. p.i. führte. Danach, offenbar infolge des fortschreitenden Zellerfalls, nimmt die Menge des zellgebundenen Virus allmählich ab.

Bemerkenswert ist der flachere Anstieg der Kurve für das zellfreie Virus vor allem in den späteren Stunden der exponentiellen Phase: Es zeigt sich, daß das Maximum des freien Virus

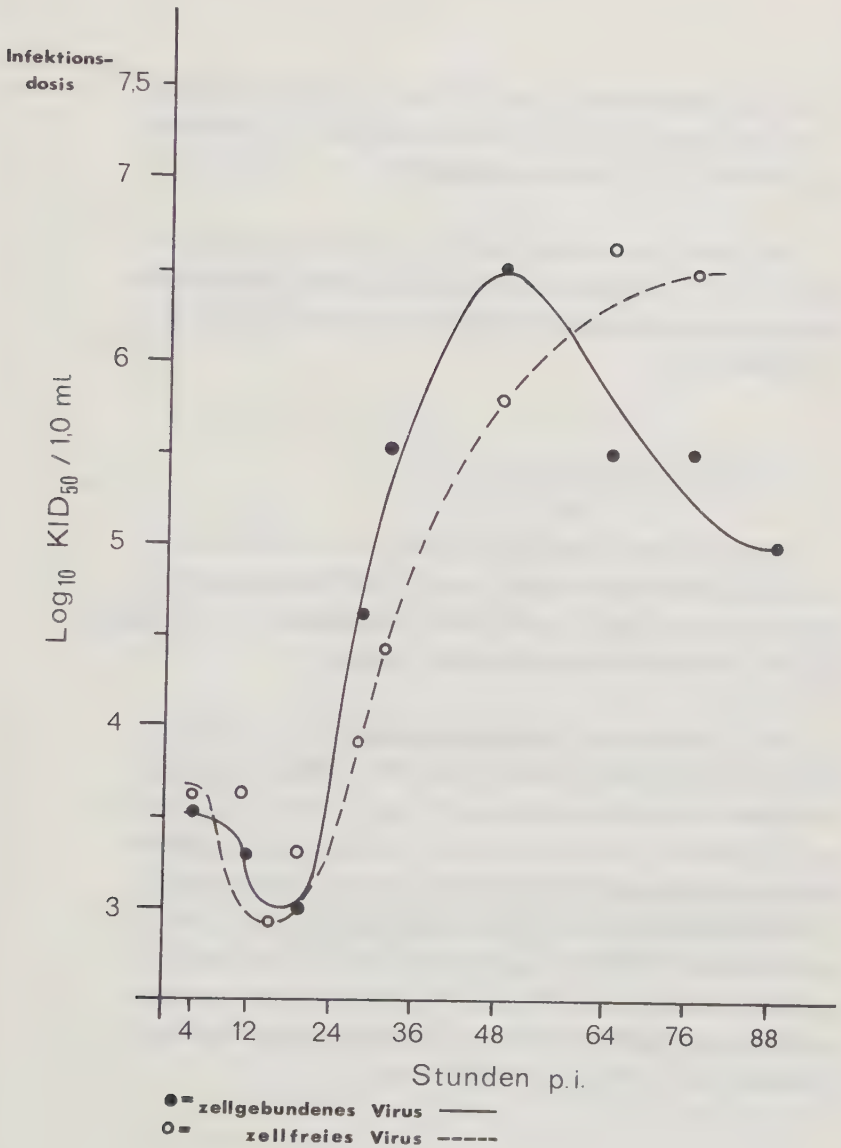


Abb. 21. Vermehrung des Agapornidenpockenstammes AP III/5 in primären Hühnerembryofibroblastenkulturen.

wesentlich später erreicht wird, d.h. also zu einem Zeitpunkt, zu dem der größte Teil der virusproduzierenden Zellen bereits abgestorben und in Lysis übergegangen ist.

Aus diesen Ergebnissen zeigt sich, daß nach einer Eklipsphase von ca. 20 Stunden der Vermehrungszyklus des untersuchten Pockenvirusstammes nach weiteren 24 Stunden bereits abgeschlossen ist.

4.4. Neutralisationsversuche

Neben der Differenzierung der Pockenviren aufgrund der morphologischen Unterschiede bei den CAM-Veränderungen und cytopathischen Effekten, sollte durch serologische Untersuchungen eine weitere Abgrenzung herbeigeführt werden.

Die Ergebnisse der Neutralisationsteste mit den Pockenvirusstämmen AP III/5, KP-1, CVA, HP-1, PP-1, TP-1 sind in der Abb. 22 graphisch dargestellt. Das im Institut hergestellte AP-Immunserum bewirkte in der 1:4-Verdünnung gegenüber der Normalserumkontrolle bei dem homologen Pockenstamm III/5 eine Plaquereduktion von 92 %. In Übereinstimmung mit den Untersuchungen von UPPAL und NILAKANTAN (85) war auch eine gewisse neutralisierende Wirkung des Serums bei den heterologen Pockenstämmen festzustellen, die jedoch immer unter 40 % gegenüber der Normalserumkontrolle lag.

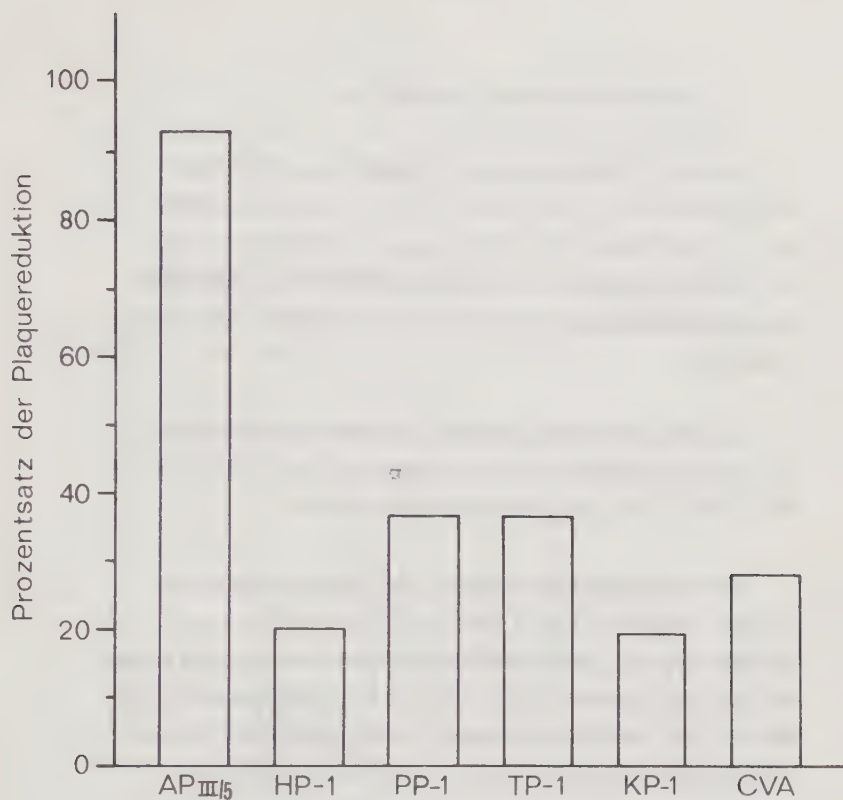


Abb. 22. Neutralisierende Wirkung des AP-Immunserums gegenüber den Pockenvirusstämmen AP III/5, HP-1, PP-1, TP-1, KP-1 und CVA dargestellt in Prozenten der Plaque-Reduktion

4.5. Präzipitationsteste im Agar-Gel

Bei den Präzipitationstesten wurde das auch für die Neutralisationsversuche benutzte AP-Immunserum eingesetzt. Weiter fanden ein HP-Immunserum (Behringwerke), ein Immunserum gegen Vacciniavirus (Prof. Mayr, München) und zwei Schweinepockenimmunseren (Prof. Mayr, München) Anwendung.

Als Antigene dienten stark veränderte Chorioallantoismembranen, die mit den Stämmen AP III/5, HP-1, TP-1, PP-1, KP-1 und CVA infiziert worden waren.

Zur Prüfung der Spezifität wurden die Seren gegen Infektiöse Bronchitis-(IB-), Newcastle Disease-(ND-) und Celo-Antigene geprüft. Dabei konnte festgestellt werden, daß keines der oben angegebenen Seren in der Präzipitationsreaktion mit den IB-, ND- und Celo-Antigenen positiv reagierte. Eine unspezifische Reaktion fand sich lediglich bei dem vom Kaninchen stammenden Vacciniaserum, das zwei schwache Präzipitationsstreifen gegen die negative CAM ausbildete. Es reagierte darüber hinaus aber spezifisch mit zwei starken Präzipitationsbanden gegen das homologe Antigen. (Bei der Präzipitation mit Säugerseren wurde für das Agarmedium eine 1 %ige NaCl-Konzentration gewählt.)

Da in Vorversuchen das AP-Immunserum mit dem AP-Antigen nur schwach präzipitierte, wurde das Serum chloroformgereinigt und die Reaktion in einem phenolhaltigen 8 %igen NaCl-Agar wiederholt.

Wie die Tabelle 1 und Abb. 23 zeigen, reagierte das gereinigte AP-Immunserum spezifisch nur mit dem homologen Stamm III/5 mit einer deutlich sichtbaren Präzipitationsbande.

Ebenso spezifisch reagierte das HP-Immunserum. Nur gegen das HP-1 Antigen wurde eine starke Präzipitationsreaktion festgestellt.

Da die Schweinepockenimmunseren mit keinem der getesteten Antigene eine sichtbare Reaktion eingingen, wurde auf die Darstellung in der Tabelle verzichtet.

Tabelle 1

Präzipitationsteste

Antigene

Seren	AP III/5	HP-1	TP-1	PP-1	KP-1	CVA
AP	++	-	-	-	-	-
HP	-	+++	-	-	-	-
CVA	-	-	-	-	-	+++

Bezeichnungen:

- + = Präzipitation gerade sichtbar
- ++ = Präzipitation deutlich sichtbar
- +++ = Präzipitation stark ausgeprägt
- = negativ

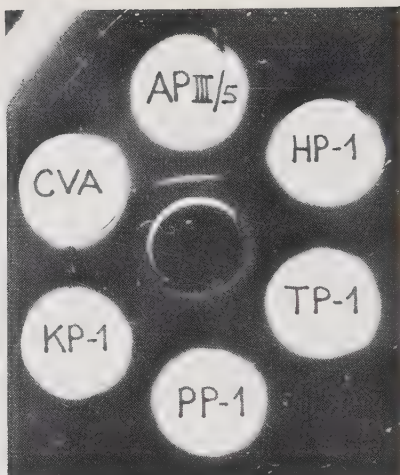


Abb. 23 Mittlerer Kreis: AP-Immunserum vom Huhn
Im Kreis die bezeichneten Test-Antigene

4.6. Äther- und Chloroformresistenzteste

Der untersuchte Pockenvirusstamm AP III/5 erwies sich als chloroformlabil. Bei der Rücktitrierung der wässrigen Phase beider Proben (mit 10- und 20 %igem Chloroformzusatz) konnte auch in der unverdünnten Flüssigkeit keine Infektiosität mehr nachgewiesen werden.

Demgegenüber führte ein 10 %iger Äthylätherzusatz bei den Pockenstämmen AP III/5, HP-1, KP-1 und CVA zu keiner wesentlichen Minderung der Infektiosität. Der 20 %ige Ätherzusatz bewirkte schon eine signifikante Titerensenkung um etwa $2 \log_{10}$. Mit weiterer Steigerung der Ätherkonzentration war eine kontinuierliche Minderung der Infektiosität verbunden. Bei 50 %igem Ätherzusatz betrug die Titerdifferenz zu den Kontrollen der vier untersuchten Pockenstämmen annähernd $4 \log_{10}$.

4.7. Elektronenmikroskopische Untersuchung

Die Abb. 24 zeigt den Anschnitt einer kompletten CAM-Zelle mit Kern (N), Mitochondrien (M) und Viruselementarkörperchen (V_1, V_2, V_3) nach der Infektion mit dem Pockenvirusstamm AP III/5 bei einer Vergrößerung von 23 000:1. Die im Zellplasma angeschnittenen Elementarkörperchen (= El. K.) werden als verschiedene Stadien der Virusvermehrung interpretiert. Das mit V_1 bezeichnete El. K. ist von einer inkompletten Membran umgeben. Offenbar wird hier fädig-granuläres Material mit einer Membran umschlossen. Bei V_2 sieht man unreife El. K. mit einer kompletten Membran. Die unter V_3 gekennzeichneten Frühformen enthalten zusätzlich eine Verdichtung (K), die von einer hellen Zone umgeben wird. Bei etwa 10 % der unreifen Formen beobachteten wir diese sogenannten Innenkörper.

Bei Schnitten von Pockenherden späterer Infektionsstadien konnten auch reife (mature) El. K. gefunden werden. Eine typische reife Form ist in der Ausschnittsvergrößerung wiedergegeben (Vergrößerung 46 000:1). Im Inneren dieser Partikel zeigt sich, anstelle des mehr homogenen Viroplasmas der Frühformen, eine charakteristische Hantelform. Zusätzlich ist auch die Partikelgrenze komplizierter aufgebaut und besteht hier aus mindestens zwei Schichten. Ein wechselnder Anteil dieser reifen Formen fand sich in späteren Infektionsstadien der CAM, wobei festzustellen war, daß innerhalb einer Zelle neben reifen auch unreife Formen anzutreffen waren.

Die Elementarkörperchengröße entspricht den für Pockenviren in der Literatur angegebenen Werten. Es wurden mittlere Durchmesser von $0,3 \mu$ gemessen.

Abb. 24. Anschnitt einer kompletten CAM-Zelle.

V_1 = Unreife El. K. -Form mit inkompletter Membran,

V_2 = Unreife El. K. mit geschlossener Membran,

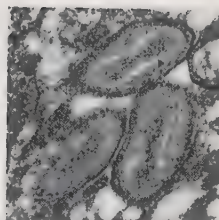
V_3 = Frühformen mit dunklem Innenkörper (K);

N = Zellkern; M = Mitochondrien;

Vergr. : 23 000 x, Vergleichsmaßstab = 0,5 μ

Ausschnittvergrößerung: Reife Elementarkörperchen,

Vergr. : 46 000 x, Vergleichsmaßstab = 0,2 μ .



Auch in der Form der El. K. des Stammes III/5 ergeben sich Übereinstimmungen mit den bekannten Geflügelpockenviren. Neben rundlichen Partikeln sind in den Zellen vorwiegend ellipsoide Formen, nicht aber quaderförmige zu finden.

4. 8. Infektionsversuche

An dieser Stelle soll das Wirtsspektrum des untersuchten Virusstammes nur zusammenfassend dargestellt werden. Einzelheiten über diese Versuche ergeben sich aus einer früheren Publikation (35). Aus der Tabelle 2 ist zu entnehmen, daß lediglich die Zwergpapageien (*A. personata* und *A. roseicollis*) nach der Infektion mit dem Isolat III/5 spezifisch erkrankten. Weiterhin gelang es, bei den künstlich infizierten Zwergpapageien das Virus aus den pockenartigen Veränderungen der Haut und bei einem Tier auch nach 46 Tagen p. i. aus der Leber zu reisolieren und damit eine stattgefundene Generalisation zu beweisen.

Tabelle 2

Wirtsspektrum des aus Zwergpapageien
isolierten Pockenvirusstammes III/5

Infektions- weg	Zwerg- papageien	Eintags- küken	12 Wochen alte Hühner	12 Wochen alte Puten	Tauben	Kanarienvögel	Wellensittiche	8 Wochen alte Enten	Kaninchen
kutan	G	0	uR	IP (mittelstark)	uR	uR	uR	IP (schwach)	0
i. v.	-	0	0	0	0	-	-	0	0
i. m.	-	0	0	0	-	0	0	-	-

Bezeichnung: G = Generalisierte Pockenerkrankung
 IP = lokale Impfpockenreaktion
 uR = unspezifische Impfreaktion
 0 = keine Reaktion
 - = nicht durchgeführt

5. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

Wie die beschriebenen Untersuchungsergebnisse zeigen, unterscheidet sich der von Zwergpapageien isolierte Pockenvirusstamm AP III/5 in mehrfacher Hinsicht von den bekannten Geflügelpockenviren (Hühner-, Puten-, Kanarien- und Taubenpocken) und dem Vacciniavirus.

Zur näheren Stammdifferenzierung war es notwendig, bekannte Geflügelpockenstämme und einen Vacciniavirusstamm weitgehend mit in die Untersuchungen einzuschließen, um im direkten Vergleich die Unterschiede der Virusstämme darstellen zu können. Da innerhalb der Pockenvirusgruppe, insbesondere aber in der Untergruppe der Geflügelpocken, zahlreiche morphologische, biologische und physikalisch-chemische Gemeinsamkeiten bestehen, kann sich eine taxonomische Einordnung des Isolats III/5 erst aus der Summe mehrerer Untersuchungen ergeben.

Für die Differenzierung der Geflügelpocken, des Vacciniavirus und der Kuhpocken haben MAYR und Mitarbeiter (40, 41, 42, 44, 47, 48, 50) zahlreiche Methoden entwickelt, die auch bei den vorgelegten Untersuchungen weitgehend Verwendung fanden.

Eine Eigenständigkeit des Isolats zeichnete sich bereits bei den ersten Untersuchungsergebnissen über das Wirtsspektrum ab (35). Während durch die kutane Infektion klinisch gesunder Zwergpapageien eine heftige lokale Pockenerkrankung und in einem Falle auch eine generalisierte Pockenerkrankung ausgelöst werden konnte, war mit Ausnahme der infizierten Puten und Enten, die lediglich eine schwache

Impfreaktion, in keinem Fall jedoch auch nach intravenöser Infektion eine stärkere Reaktion zeigten, bei keiner der untersuchten Tierarten eine spezifische Erkrankung zu beobachten. Da nach intramuskulärer bzw. intravenöser Applikation des Pockenstammes III/5 weder Eintagsküken, Hühner, Puten, Enten, Tauben, Wellensittiche, Kanarienvögel noch Kaninchen erkrankten, war eine Zuordnung des Virusstammes AP III/5 zu einem der bekannten Geflügelpockenstämme, zum Vacciniavirus oder auch zu dem von SHARMA et al.(80) isolierten Pockenstamm nicht möglich.

Inwieweit das Isolat AP III/5 ausschließlich für Zwergpapageien oder aber auch für andere Psittacidenarten mit Ausnahme der Wellensittiche als pathogen anzusehen ist, konnte durch Infektionsversuche, insbesondere mit anderen Papageienarten, aus Kostengründen nicht eindeutig geklärt werden. Bei den drei bekanntgewordenen Pockenausbrüchen in Berliner Zoohandlungen konnte jedoch beobachtet werden, daß lediglich die vorrätig gehaltenen Zwergpapageien krustige und geschwürige Veränderungen an den Augenlidern, an der Kopfhaut und auch im Bereich der Kehle zeigten und daß auch zahlreiche Todesfälle auftraten, während im gleichen Käfig oder in unmittelbarer Nachbarschaft gehaltene andere Papageienarten, Großsittiche, Wellensittiche und auch Kanarienvögel klinisch nicht erkrankten. Eine Identität mit dem Kanarienspockenvirus konnte sowohl durch die Infektionsversuche als auch durch die weiteren virologischen Untersuchungen ausgeschlossen werden.

Weniger deutlich war die Eigenständigkeit des Pockenstammes III/5 in der Eikultur ausgeprägt. Die Herdbildungen auf der Chorionallantoismembran zeigten in den ersten Eipassagen eine gewisse Ähnlichkeit mit den Primär- und Sekundärherden beim Kanarienspockenvirus. Im Laufe weiterer Eipassagen des Stammes III/5 kam es, ähn-

lich wie beim Hühner- und Putenpockenvirus, zu Ringzonenbildungen, oberflächlichen Nekrosen der Herde auf der CAM, und auch die Absterberate der Embryonen stieg bis zum 6. Tag der Infektion auf ca. 70-80 % an. Dieses unterschiedliche Verhalten im Hühnerembryo läßt sich mit einer Adaptation des Virus an das Kultursystem erklären. Gleichzeitig wird aber aus diesen Ergebnissen deutlich, daß eine diagnostische Aussage mit Hilfe der Eikultur nur bedingte Aussagekraft besitzt, zumal auch bei homologen Pockenvirusstämmen mit Unterschieden im CAM-Bild zu rechnen ist und - wie oben erwähnt - rasch eine Eiadaptation eintritt.

Bei den Untersuchungen mit dem Pockenstamm III/5 in Zellkulturen aus Hühnerembryofibroblasten fanden sich auffällige Unterschiede im Vergleich zu den bekannten Geflügelpockenstämmen und dem Vacciniavirus. Der untersuchte Pockenstamm zeichnete sich besonders durch seine leichte Anzüchtbarkeit und rasche Vermehrung aus. Wurden die Zellkulturen mit hohen Virusdosen infiziert, so kamen schon nach 24 Stunden die ersten Zellabkugelungen zur Ausbildung. Nach weiteren 24 Stunden waren 100 % der Zellen abgekugelt, und gleichzeitig fanden sich zahlreiche lytische Bezirke im Zellrasen. Am 4. Tag p.i. waren die Kulturen nahezu vollständig zerstört. Ein ähnlich rascher und totaler Zellzerfall konnte nur beim Vaccinia- und Kanarienspockenvirus beobachtet werden. Während jedoch die cytopathischen Veränderungen beim Kanarienspocken- und Vacciniavirus in erster Linie durch ein gleichzeitiges Einsetzen von Lysis, Abkuglung und scholligem Zerfall gekennzeichnet sind, ließen sich bei den Kulturveränderungen des Agapornidenvirus deutlich zwei Phasen unterscheiden. Diese für die Geflügelpocken typischen Phasen der Zellabkuglung und Lysis (42, 47) traten bei gleicher Infektionsdosis bei Hüh-

ner- und Putenpocken erst mit einer Verzögerung von etwa zwei Tagen auf.

Die sich aus den Versuchen über die Vermehrungskinetik des Pockenstammes AP III/5 ergebenden Kurven veranschaulichen die Zeitdauer der Virusvermehrung. Aus dem einphasigen Verlauf der Kurven geht hervor, daß bei der gewählten Infektionsdosis die Forderung der Einzyklusvermehrung erfüllt werden konnte. Bei einem Vergleich der Untersuchungen von GAFFORD et al. (18) und CHANG et al. (10) über die Vermehrung des Hühnerpockenvirus sprechen der zeitliche Verlauf sowie der Anstieg der Vermehrungskurven von CHANG et al. nicht für eine Einzyklusvermehrung des Virus. Für die vergleichende Betrachtung von Hühnerpocken- und Agapornidenpockenvermehrung werden deshalb die Ergebnisse von GAFFORD et al. herangezogen.

Die für den Pockenvirusstamm AP III/5 empirisch gewählte Adsorptionszeit von 90 Minuten schien für eine maximale Zellinfektion ausreichend zu sein. Dieses Ergebnis stimmt mit den Untersuchungen von GAFFORD et al. überein, die im "infectious-centers-Test" über eine 90-minütige Adsorption hinaus keine Erhöhung der Titer mehr erreichten.

Während beim Hühnerpockenvirus die Phase der exponentiellen Virusvermehrung in der 36.-72. Stunde p.i. und das Maximum der Infektiosität 72-96 Stunden p.i. nachgewiesen wurden, setzte beim Agapornidenpockenstamm nach einer Eklipsphase von ca. 20 Stunden die exponentielle Virusvermehrung ein, wobei der maximale Titer schon 48 Stunden p.i. erreicht wurde. Daraus resultiert für den Pockenstamm III/5 gegenüber dem Hühnerpockenvirus eine um etwa 12 Stunden verkürzte Eklipsphase und auch eine um durchschnitt-

lich 12 Stunden kürzer und früher beginnende Vermehrungsphase. Diese Differenz ist als sehr erheblich anzusehen, insbesondere wenn man berücksichtigt, daß für die vorliegenden Untersuchungen in gleicher Weise wie bei GAFFORD et al. Hühnerembryofibroblastenkulturen mit im wesentlichen gleichen Kulturmedien Verwendung fanden.

Sieht man von der zeitlichen Verzögerung der HP-Virusvermehrung ab, so ergeben sich im Charakter der Agapornidenpocken- und Hühnerpockenvermehrung Ähnlichkeiten. Diese Gemeinsamkeiten bestehen besonders hinsichtlich der Dauer der Virusadsorption, des steilen Titeranstiegs des zellgebundenen Virus in der exponentiellen Vermehrungsphase und der langsamen Ausschleusung.

Bei einem Vergleich mit den Angaben der Literatur zur Vermehrungskinetik des Vacciniavirus finden sich ähnliche Übereinstimmungen (82, 84), jedoch zeigt sich deutlich, daß der zeitliche Ablauf der Vacciniavermehrung gegenüber der Agapornidenpockenvermehrung wesentlich rascher erfolgt (76, 81). Für die Dauer der Eklipsphase wurden ca. 6-8 Stunden angegeben (17, 76), und die Maximaltiter wurden etwa zwischen der 24. und 36. Stunde p.i. erreicht (17, 82, 84). Zu berücksichtigen ist hierbei allerdings, daß die Versuche mit dem Vacciniavirus teilweise in verschiedenartigen Zellkulturen (Hela-, L- und Affennierenzellen) durchgeführt wurden, so daß die Werte nur bedingt mit den Ergebnissen dieser Untersuchungen vergleichbar sind.

Es war im Rahmen der vorliegenden Arbeit leider nicht möglich, unter gleichen Versuchsbedingungen die Vermehrung aller Referenzstämme zu untersuchen. Es ist jedoch bei Berücksichtigung des bereits vorn besprochenen Auftretens der cytopathischen Veränderungen

mit großer Sicherheit zu sagen, daß eine ebenso schnelle Vermehrung, wie sie den Agapornidenstamm III/5 auszeichnet, unter den bekannten Vogelpockenviren höchstens beim Kanarienvogelpockenvirus zu erwarten ist. Im übrigen muß hervorgehoben werden, daß bei allen Vogelpockenviren derartige Untersuchungen insofern problematisch sind, als hohe Virustiter, wie sie zur Erreichung der Bedingungen für eine Einzyklusvermehrung erforderlich sind, in Zellkulturen nicht immer erreicht werden können.

Bei den vergleichenden Untersuchungen zur Plaquebildung der einzelnen Pockenvirusstämme ist die von MAYR und KALCHER (48) entwickelte Technik eine wertvolle Hilfe zur Stammdifferenzierung. Wie aus den Abbildungen 14 - 20 und den beschriebenen Untersuchungsergebnissen hervorgeht, konnten die von MAYR et al. (42, 48) beschriebenen Plaqueformen weitgehend reproduziert werden. Lediglich im zeitlichen Auftreten dieser Kulturveränderungen ergaben sich Unterschiede. Während MAYR (42) eine endgültige Auswertung der Geflügelpockenplaques erst am 11. Tag p.i. vornehmen konnte, genügte bei dem von uns verwendeten Kultursystem für die HP-, PP- und TP-Plaques eine 8-tägige Bebrütung und beim KP-Virus, wie auch beim AP III/5- und Vacciniavirusstamm, eine 5-tägige Bebrütungszeit. Die zeitlichen Unterschiede im Auftreten der Plaques werden auf die verschiedenartige Zusammensetzung der Nährmedien zurückgeführt. Diese Ergebnisse bestätigen erneut die Notwendigkeit, bei differentialdiagnostischen Untersuchungen bekannte Pockenvirusstämme vergleichend anzuzüchten.

Schon bei der Beobachtung der cytopathogenen Veränderungen in der Hühnerembryofibroblastenkultur zeigt sich bei den Stämmen

AP III/5, CVA und KP-1 eine bedeutend raschere Vermehrungsfähigkeit im Vergleich zu den Stämmen HP-1, PP-1 und TP-1. Die stärkere Virulenz der erstgenannten Stämme für die Zellkultur bedingte auch ein rascheres Auftreten der Plaques unter dem agarhaltigen Nährmedium. Bei einem Vergleich der Taubenpocken- und Vacciniaplaques mit den Agapornidenpockenplaques am 5. Tag p.i. unterschied sich der Stamm AP III/5 eindeutig von den übrigen Virusstämmen. Insbesondere ist die Größe der AP-Plaques hervorzuheben. Mit einem Durchmesser bis zu 0,8 cm waren sie fast doppelt so groß wie beim Kanarien- und Vaccinia-virus. Infolge des einheitlichen Zerfallgrades der Zellen im Inneren der Plaques und der scharfen und glatten äußeren Begrenzung durch eine schmale Zone abgekugelter Zellen entstand eine für den Agapornidenpockenstamm so charakteristische und unverwechselbare Plaquebildung, wie sie auch in ähnlicher Weise bei den HP-, TP- und PP-Plaques am 8. Tag p.i. nicht zur Ausbildung kam.

Bei der Beurteilung der Plaques sind zwei Charakteristika hervorzuheben. Und zwar zeichnen sich zum ersten in allen Kulturen die Agapornidenvirusplaques durch einen scharfen und glatten Rand aus, der in dieser Form bei keinem anderen der untersuchten Vogelpockenvirusstämmen zu beobachten war. Vielmehr traten bei diesen, von Stamm zu Stamm unterschiedlich, gezackte und teilweise auch unscharfe Ränder in Erscheinung. Als zweites ist hervorzuheben, daß alle Plaques des Isolats AP III/5 weitgehend einheitlich in ihrer Größe waren, und daß sich die Form der Plaques auch in Kulturen unterschiedlicher Passagen nicht änderte. Diese Feststellungen sprechen dafür, daß der in den Versuchen verwendete Virusstamm, obgleich er nicht geklont war, genetisch sehr einheitlich ist.

Die Ergebnisse der serologischen Untersuchungen im Agar-Gel-Präzipitationstest und die Virusneutralisationsversuche bestätigen die Befunde in der Eikultur, Zellkultur und zum Wirtsspektrum des Agapornidenpockenstammes insofern, als sich die Eigenständigkeit des Stammes AP III/5 auch durch eine spezifische Präzipitation und eindeutige stammspezifische Virusneutralisation belegen ließ.

Die Ergebnisse der Neutralisationsversuche erbrachten eine spezifische neutralisierende Wirkung des verwendeten Serums gegen das homologe AP-Antigen. Darüber hinaus konnte zwar auch eine gewisse neutralisierende Wirkung auf die übrigen Geflügel-pockenstämme festgestellt werden, jedoch zeigte sich gegenüber dem homologen Virus eine mehr als doppelt so starke Neutralisationswirkung.

Ähnliche serologische Beziehungen innerhalb der Geflügel-pockengruppe fanden UPPAL und NILAKANTAN (85) auch in der Präzipitationsreaktion. Bei der Verwendung hochtitriger Immunsereen wurden offensichtlich neben stammspezifischen auch gruppenspezifische Antikörper nachgewiesen. Die alleinige spezifische Reaktion der verwendeten AP- und HP-Seren könnte mit dem relativ geringen Gehalt der Seren an präzipitierenden Antikörpern in Zusammenhang stehen, so daß gruppenspezifische Antikörper nicht miterfaßt wurden.

Eine mögliche Verwandtschaft des Stammes AP III/5 mit dem Schweinepockenvirus konnte ebenfalls durch die Präzipitationsteste ausgeschlossen werden.

Wie sich im Chloroformresistenztest zeigte, war der Pockenstamm AP III/5 chloroformlabil. Dieses Ergebnis überraschte bei dem 300 nm großen Virus insofern nicht, als sich besonders die großen Virusarten durch einen hohen Lipoidgehalt auszeichnen (5, 31, 45).

Die geringen morphologischen Unterschiede der Pockenviren erklären auch das nahezu gleiche Verhalten gegenüber der Äthylätherbehandlung. Während bei 10 %igem Ätherzusatz die Infektiosität nur unwesentlich beeinflusst wurde, zeichnete sich mit steigender Ätherkonzentration eine kontinuierliche Titerensenkung ab, die bei den Pockenvirusstämmen AP III/5, HP-1, TP-1 und CVA durch den 50 %igen Ätherzusatz bis zu $4 \log_{10}$ betrug. Daraus ergibt sich, daß diese Pockenviren als relativ ätherresistent anzusehen sind.

Durch die elektronenmikroskopische Darstellung der Agapornidenpockenelementarkörperchen in infizierten Chorioallantoismembranen konnte die Pockenätiologie des untersuchten Virusstammes eindeutig belegt werden.

Die in der Abb. 24 dargestellten ovoiden Frühformen entsprechen in ihrer Größe und Morphologie weitgehend den von HERZBERG et al. (25, 26) beim Kanarienvirus gefundenen und als Form 1, 2 und 3 bezeichneten Elementarkörperchen. Ähnliche Frühformen konnten beim Hühnerpockenvirus (1, 61, 62, 83), beim Taubenpockenvirus (49), aber auch beim Vacciniavirus (32, 62, 83) und beim Schweinepockenvirus (69) nachgewiesen werden.

Um eventuelle differentialdiagnostische Anhaltspunkte zu anderen Pockenviren darzustellen, müßte durch weitere Untersuchungen die Feinstruktur des Agapornidenpockenvirus näher untersucht werden.

Da in allen Schnitten durch reife und unreife Elementarkörperchen ausschließlich rundliche bzw. ellipsoide Körperchen gefunden wurden, rückt erneut die oft diskutierte Frage nach der präparationsbedingten Verformung der Viruselementarkörperchen in den Vordergrund. Im Hinblick auf eine Eingruppierung des Isolats kann aufgrund der vorliegenden elektronenmikroskopischen Befunde der Pockenvirusstamm AP III/5 der von JOKLIK (30, 31) zusammengefaßten Vaccinia-Untergruppe (Vaccinia-, Myxoma- und Geflügelpockenuntergruppe) der Pockenviren zugeordnet werden.

Betrachtet man die Summe der Ergebnisse aus den vorliegenden Untersuchungen, so erscheint es gerechtfertigt, aufgrund der in Infektionsversuchen, in Kulturversuchen und in serologischen Versuchen festgestellten Eigenheiten des Isolats AP III/5 von einem weitgehend eigenständigen Pockenvirusstamm, dem Agapornidenpockenvirus, zu sprechen. Ob dieses Virus auch für weitere Papageienarten pathogen ist, d. h. also als Papageienpockenvirus anzusprechen wäre, muß weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Der aus Zwergpapageien (*Agapornis personata* und *Agapornis roseicollis*) isolierte Pockenvirusstamm AP III/5 wurde vergleichend mit bekannten Hühner-, Puten-, Tauben-, Kanarienvirusstämmen und einem Vacciniavirusstamm untersucht. Im einzelnen wurden folgende Ergebnisse erzielt:

1. Bei Infektionsversuchen erwies sich der Pockenvirusstamm AP III/5 als pathogen nur für Zwergpapageien.
2. In der Eikultur fanden sich Ähnlichkeiten, aber keine Übereinstimmungen mit den Herdbildungen beim Kanarienvirus-, Hühner- und Putenpockenvirus.
3. Das Agapornidenpockenvirus bildete in Hühnerembryo-fibroblasten-(HEF-)kulturen bis 8 mm große runde Plaques mit einem glatten Rand, die sich von allen übrigen Geflügelpockenplaques deutlich unterscheiden.
4. Der untersuchte Pockenvirusstamm zeichnete sich besonders durch seine rasche Vermehrung in HEF-Kulturen aus. Im Vergleich zu Angaben über das Hühnerpockenvirus war der Vermehrungszyklus um durchschnittlich 12-18 Stunden verkürzt.
5. Der Agapornidenpockenstamm konnte eindeutig in der Präzipitations- und Neutralisationsreaktion von den

bekannten Geflügelpockenviren und dem Vacciniavirus differenziert werden.

6. Bei der elektronenmikroskopischen Darstellung der Pockenviruselementarkörperchen des Stammes AP III/5 und in Äther- und Chloroformresistenztesten fanden sich keine wesentlichen Unterschiede zu den Viren der Geflügelpockenuntergruppe.

Der untersuchte Virusstamm AP III/5 wird als ein weitgehend eigenständiges Agapornidenpockenvirus innerhalb der Geflügelpockengruppe angesehen.

7. SUMMARY

The pox virus strain AP III/5, isolated from love birds (*Agapornis personata* and *Agapornis roseicollis*), was comparatively investigated with the known virus strains of fowl, turkey, pigeon, canary pox and a vaccinia virus strain. The following results were obtained:

1. The pox virus strain AP III/5 proved to be pathogenic in infection trials only for love birds.
2. The pox lesions in egg cultures were similar but not identical to those of canary, fowl and turkey pox viruses.
3. In chick embryo monolayers, the *Agapornis* pox virus forms round, smoothedged plaques up to 8 mm in diameter, which are clearly distinguished from all other poultry pox plaques.
4. The investigated pox virus strain is especially characterized by rapid multiplication in chick embryo monolayers. The cycle of multiplication was, on the average, 12 to 18 hours shorter than that of fowl pox virus.
5. The *Agapornis* pox strain could be clearly differentiated from the known poultry pox viruses and vaccinia virus by precipitation and neutralization reactions.
6. In electron microscopical demonstration of the pox virus elementary bodies, and in ether and chloroform resistance tests, no important differences were found from the viruses of the poultry pox virus subgroup.

Within the group of poultry pox viruses, the investigated strain AP III/5 may be considered an independent *Agapornis* pox virus.

8. LITERATURVERZEICHNIS

1. ARHELGER, R. B. and C. C. RANDALL: Electron microscopic observations on the development of fowlpox virus in chorio-allantoic membrane. *Virology* 22, 59 (1964)
2. ASCH, B. B. and G. E. GIFFORD: Accelerated plaque formation by fowlpox virus in the presence of chymotrypsin. *American Society for Microbiology* 18, 897 (1969)
3. BAXENDALE, W.: Studies of three avian viruses and the development of an improved fowl pox vaccine. *Vet. Rec.* 88, 5 (1971)
4. BIERBAUM, K. und R. WEITZENBERG: Pocken der Vögel, in: *Handbuch der Viruskrankheiten*, Gustav Fischer Verlag, Jena, Bd 1, 311-341 (1939). Hrsg. von Gildemeister, E., E. Haagen und O. Waldmann
5. BÖGEL, K. und A. MAYR: Untersuchungen über die Chloroformresistenz der Enteroviren des Rindes und des Schweines. *Zbl. Vet. Med.* 8, 908 (1961)
6. BÖGEL, K. und A. MAYR: Ein Resistenztest mit Detergentien zur Charakterisierung von Viren. *Zbl.f. Bakt.* 186, 134 (1962)
7. BOLLINGER, O.; *Virchows Arch. path. Anat.* 58, 349 (1873).
- zit. n. Röhrer (1967)
8. BORREL-BURNET (1906)
- zit. n. Bierbaum u. Weitzenberg (1939)
- zit. n. Röhrer (1967)
9. BÜTTNER, D., H. GIESE, G. MÜLLER und D. PETERS:
Die Feinstruktur reifer Elementarkörper des Ecthyma contagiosum und der Stomatitis papulosa.
Arch. ges. Virusforschg. 14, 657 (1964)

10. CHANG, Pei W. and V. JASTY: Multiplication of fowlpox virus in chicken embryo fibroblastic cell cultures.
Am. J. Vet. Res. 31, 1463 (1970)
11. DALES, S. and R. KAJIOKA: The cycle of multiplication of vaccinia virus in Earle's strain L cells. 1. Uptake and penetration. Virology 24, 278 (1964)
12. DALES, S. and L. SIMINOVITCH: The development of vaccinia virus in Earle's L-strain cells as examined by electron microscopy. J. biophys. biochem. Cytol. 10, 475 (1961)
13. DULBECCO, R. : Production of plaques in monolayer tissue cultures by single particles of an animal virus.
Proc. Nat. Acad. Sci. 38, 747 (1952)
14. DULBECCO, R. and M. VOGT: Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses.
J. exp. Med. 99, 167 (1954)
15. FENNER, F. : The biology of animal viruses.
Academic press, New York and London (1968), Volume I, Molecular and cellular Biology
16. FRITZSCHE, K. und E. GERRIETS: Geflügelkrankheiten, Kap. 7, Pocken, Verlag Paul Parey, Berlin u. Hamburg, 2. Auflage (1962)
17. FURNESS, G. and J.S. YOUNGNER: Onestep growth curves for vaccinia virus in cultures of monkey kidney cells.
Virology 9, 386 (1959)
18. GAFFORD, L.G., F. SINCLAIR and C.C. RANDALL:
Growth cycle of fowlpox virus and change in plaque morphology and cytopathology by contaminating mycoplasma.
Virology 37, 464 (1969)
19. GOLLUB, H. : Versuche mit einem filtrierbaren Virus bei einer übertragbaren Kanarienvogelkrankheit.
Zbl. Bakt. I. Orig. 125, 313 (1932)

20. GRATZL, E. und H. KÖHLER: Spezielle Pathologie und Therapie der Geflügelkrankheiten. Ferdinand Enke-Verlag, Stuttgart (1968)
21. HEELSBERGEN, T. van, Handbuch der Geflügelkrankheiten u. d. Geflügelzucht, Enke, Stuttgart (1929)
- zit. n. Fritzsche und Gerriets (1962)
22. HERRLICH, A. : Die Pocken, Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1967) 2. neubearbeitete u. erweiterte Auflage
23. HERRLICH, A. und A. MAYR: Die Differenzierung der Tierpockenviren im bebrüteten Hühnerei. Arch. Hyg. (Berl.) 139, 444 (1955)
24. HERZBERG, K., A. KLEINSCHMIDT, K. REQUARDT und W. VOGEL: Elektronenmikroskopische Untersuchungen am Kanarienvirus, 2. Mitt., Arch. ges. Virusforsch. VI, 283 (1956)
25. HERZBERG, K. und A. KLEINSCHMIDT: Elektronenmikroskopische Untersuchungen am Kanarienvirus, 3. Mitt. - Dünnschnittbefunde, Zbl. f. Bakt. 174, 1 (1959)
26. HERZBERG, K., A. KLEINSCHMIDT und D. LANG: Weitere Dünnschnitt-Untersuchungen am Kanarienvirus, 4. Mitt., Zbl. f. Bakt. 179, 308 (1960)
27. HERZBERG, K., A. KLEINSCHMIDT, D. LANG und K. REUSS: Vaccinevirus und Kanarienvirus elektronenmikroskopisch bei Negativkontrastierung. Naturwissenschaften 48, 725 (1961)
28. HERZBERG, K., A. KLEINSCHMIDT, D. LANG, K. REUSS und R. DAHN: Vergleichende Virusdarstellung mit Phosphorwolframsäure (Variola-Vakzine, Kanarienvirus, Varizellen und Zoster), Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 188, 440 (1963)

29. HYDE, J. M. , L. G. GAFFORD and C. C. RANDALL:
Molecular weight determination of fowlpox virus DNA
by electron microscopy. *Virology* 33, 112 (1967)
30. JOKLIK, W. K. : The poxviruses; *Bacteriol. Rev.* 30, 33 (1966)
31. JOKLIK, W. K. : The poxvirus and Herpesvirus Group
in: *Molecular basis of virology*, ACS Monograph 164,
Edited by H. Fraenkel-Conrat
Reinhold Book Corporation, New York, Amsterdam,
London (1968)
32. KAJIOKA, R. , L. SIMINOVITCH and S. DALES: The cycle
of multiplication of vaccinia virus in Earle's strain
L cells. II. Initiation of DNA Synthesis and Morpho-
genesis. *Virology* 24, 295 (1964)
33. KIKUTH, W. : Über ein filtrierbares Virus bei einer über-
tragbaren Kanarienvogelkrankheit. *Zbl. Bakt. I. Orig.* 127,
185 (1932)
34. KÖHLER, H. und W. SCHWÖBEL: Über die Vermehrung von
Hühnerpockenvirus in der Gewebekultur.
Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 166, 454 (1956)
35. KRAFT, V. und P. TEUFEL: Nachweis eines Pockenvirus
bei Zwergpapageien (*Agapornis personata* und *Agapornis*
roseicollis). *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* 84, 83 (1971)
36. LIPSCHÜTZ, B. : Untersuchungen über Epithelioma conta-
giosum der Vögel. *Zbl. Bakt. I. Orig.* 46, 609 (1908)
- zit. n. Bierbaum und Weitzenberg
37. MANSI, W. : The study fo some viruses by the plate gel
diffusion test. *J. Comp. Path. Ther.* 67, 297 (1957)
38. MANSI, W. : Slide gel diffusion precipitin test.
Nature 181, 1289 (1958)

39. MARX, E. und A. STRICKER, Dtsch.med. Wschr. 28, 893 (1902)
- zit. n. Röhler (1967)
40. MAYR, A.: Verhalten von Hühner-, Tauben- und Kanarienviren im Küken nach intravenöser Impfung.
Zbl. f. Bakt., 1 Orig. 178, 149 (1960)
41. MAYR, A.: Untersuchungen über die Lagerfähigkeit von Geflügelviren im nativen Zustande. Mh. Tierheilkde. 14, 332 (1962)
42. MAYR, A.: Neue Verfahren für die Differenzierung der Geflügelviren. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 76, 316 (1963)
43. MAYR, A.: Beziehungen zwischen Ringzonenphänomen und Interferon. Zbl. f. Bakt., 1 Orig. 195, 227 (1964)
44. MAYR, A.: Eine einfache und schnelle Methode zur Differenzierung zw. Vaccine-(poxvirus officinale) und Kuhpockenvirus (poxvirus bovis). Zbl. Bakt. I. Orig. 199, 144 (1966)
45. MAYR, A. und K. BÖGEL: Der Chloroform-Resistenztest zur Isolierung und Charakterisierung von Enteroviren.
Zbl. f. Bakt. 182, 564 (1961)
46. MAYR, A., F. HARTIG und J. BAYR: Entwicklung eines Impfstoffes gegen die Kanarienviren auf der Basis eines attenuierten Kanarienviren-Kulturvirus.
Zbl. Vet. Med., Reihe B 12, 41 (1964)
47. MAYR, A. und K. KALCHER: Vergleichende Studien über die Züchtung von Geflügelviren in der Zellkultur.
Arch. f. d. ges. Virusforsch. 10, 72 (1960)
48. MAYR, A. und K. KALCHER: Plaque-Bildung bei den Geflügelviren. Arch. f. d. ges. Virusforsch. 11, 307 (1962)
49. MAYR, A. und H. MAHNEL: Intrazellulärer Abbau von Taubenviren in den Spätstadien der Infektion.
Arch. f. d. ges. Virusforsch. 17, 42 (1965)

50. MAYR, A. und H. MAHNEL: Charakterisierung eines vom Rhinoceros isolierten Hühnerpockenvirus.
Arch. f. d. ges. Virusforsch. 31, 51 (1970)
51. MAYR, A. und K. MALICKI: Attenuierung von virulenten Hühnerpockenvirus in Zellkulturen und Eigenschaften des attenuierten Virus. Zbl. Vet. Med., Reihe B 13, 1 (1965)
52. MAYR, A. und G. WITTMANN: Zur Pathogenese der Hühnerpockeninfektion. I. Teil: Das klinische und histologische Bild der Geflügelpockeninfektion im bebrüteten Hühnerei bei verschiedenen Stämmen. Mh. Tierheilkde 8, 264 (1956a)
53. MAYR, A. und G. WITTMANN: Zur Ringzonenbildung in virusinfizierten tierischen Geweben.
I. Mit., Zbl. Vet. Med. 3, 219 (1956b)
II. Mit., Zbl. Vet. Med. 3, 641 (1956c)
54. MAYR, A. und G. WITTMANN: Zur Pathogenese der Hühnerpockeninfektion. III. Teil: Die Pathogenese der Geflügelpockeninfektion des Kükens. Mh. Tierheilkde 9, 44 (1957)
55. MORGAN, C., S. ELLISON, H. ROOSE and D. MOORE:
Structure and development of viruses observed in the electron microscope. J. exp. Med. 100, 301 (1954)
56. MÜLLER, G. und D. PETERS: Substrukturen des Vaccinevirus, dargestellt durch Negativkontrastierung.
Arch. f. d. ges. Virusforsch. 13, 435 (1963)
57. NAGINGTON, J. and R. W. HORNE: Morphological studies of orf and vaccinia viruses. Virology 16, 248 (1962)
58. NAGINGTON, J., A. A. NEWTON and R. W. HORNE:
The structure of Orfvirus; Virology 23, 461 (1964)
59. NIELSEN, G. und D. PETERS: Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Initialstadien der Vaccinevirusinfektion von He-La-Zellen; Arch. ges. Virusforsch. 12, 496 (1962)

60. OUCHTERLONY, O. : Antigen-antibody reactions in gels.
Act.path. microbiol. scand. 25, 186 (1948)
61. PATRIZI, G. and J. N. MIDDELKAMP: Immature forms of
vaccinia virus: Morphological observations from thin
sections of infected human skin. Virology 34, 189 (1968)
62. PETERS, D. : Morphologie menschen- und tierpathogener
Viren. Zbl. f. Bakt. I. Orig. 176, 259 (1959)
63. PETERS, D. und D. BÜTTNER: Elektronenmikroskopische
Untersuchungen zur Lokalisierung der DNS im Core des
Vaccinia-Virus. Zbl. f. Bakt. I. Orig. 198, 287 (1965)
64. PHILIPSON, L. : Water-organic solvent phase systems, in:
Methods of virology, Maramorosch, K. and H. Koprowski.
Academic press. Vol. II, 1967
65. PORTERFIELD, J. S. and A. C. ALLISON: Studies with
poxviruses by an improved plaque technique.
Virology 10, 233 (1960)
66. POSTLETHWAITE, R. : A plaque technique for the titration
of vaccinia virus in chick embryo cells and some features
of vaccinia infection in this system. Virology 10, 466 (1960)
67. RANDALL, C. C. , L. G. GAFFORD and R. W. DARLINGTON:
Bases of the nucleic acid of fowlpox virus and host deoxy-
ribonucleic acid. J. Bacteriol. 83, 1037 (1962)
68. RANDALL, C. C. , L. G. GAFFORD, R. W. DARLINGTON and
J. HYDE: Composition of fowlpox virus and inclusion matrix.
J. Bacteriol. 87, 939 (1964)
69. RECZKO, E. : Elektronenmikroskopische Untersuchungen der
mit originären Schweinepocken infizierten Bauchhaut des
Ferkels. Arch. f. d. ges. Virusforschg. 9, 193 (1959)
70. RECZKO, E. : Zur Morphologie der Pockenviren.
Arch. f. d. ges. Virusforschg. 12, 269 (1963)

71. REED, L.J. and MUENCH, H. : A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Hyg.* 27, 493 (1938)
72. RIVOLTA (1869), o.V., zit. n. Gratzl-Köhler (1968)
73. RODRIGUEZ-BURGOS, A., A. CHORDI, R. DIAZ, J. TORMO: Immunoelectrophoretic analysis of vaccinia virus. *Virology* 30, 569 (1966)
74. RÖHRER, H., Handbuch der Virusinfektionen bei Tieren, VEB Gustav Fischer Verlag Jena, Bd II (1967)
75. ROLLE, M. und A. MAYR: Mikrobiologie und allgem. Seuchenlehre. Ferdinand Enke Verlag Stuttgart (1966)
76. SALZMAN, N. P. : The rate of formation of vaccinia deoxyribonucleic acid and vaccinia virus. *Virology* 10, 150 (1960)
77. SCHMIDT, U. : Untersuchungen über die Verwendbarkeit von Gewebekulturantigenen zum Nachweis der Infektiösen Bronchitis, Infektiösen Laryngotracheitis, Geflügelpocken- und CECO-Virusinfektion mit Hilfe des Agar-Gel-Präzipitationstestes. *Arch. exp. Vet.-Med.* 23, 1095 (1969)
78. SCHMIDT, U. : Die Agar-Gel-Präzipitationsreaktion in der praktischen Diagnostik der Geflügelpocken. *Arch. exp. Vet.-Med.* 23, 1085 (1969)
79. SEVER, J. L. : Applications of a microtechnique to viral serological investigations. *J. Imm.* 88, 320 (1962)
80. SHARMA, U. K., J. SIMON and L. E. HANSON: Histologic study of tissue reaction in canaries and chicken embryos infected with a pox agent, isolated from parakeets. *Avian Dis.* 12, 594 (1968)
81. SHATKIN, A. J. and N. P. SALZMAN: Deoxyribonucleic acid synthesis in vaccinia virus-infected He-La cells. *Virology* 19, 551 (1963)
82. SHEEK, M. R. and W. E. MAGEE: An autoradiographic study on the intracellular development of vaccinia virus. *Virology* 15, 146 (1961)

83. SIMPSON, C. F. : Fowl pox inclusion-body formation in skin epithelium of chicks. Avian Dis. 13, 89 (1969)
84. SMITH, K.O. and D.G. SHARP: Interaction of virus with cells in tissue cultures. I. Adsorption on and growth of vaccinia virus in L cells. Virology 11, 519 (1960)
85. UPPAL, P. K. and P. R. NILAKANTAN: Studies on the serological relationship between avian pox, sheep pox, goat pox and vaccinia viruses. J. Hyg., Camb. 68, 349 (1970)
86. WILDY, P. : Data sheets for J. C. N. V. meetings, Mexico City, August 1970
87. WITTMANN, G. : Der Nachweis präzipitierender Antikörper bei der Hühnerpockeninfektion mit Hilfe des Agar-Diffusionsverfahrens. Zbl. Vet. Med. 5, 769 (1958)
88. WITTMANN, G. und H. D. MATHEKA: Zur Verwendung von Chloroform als bakterizides Mittel bei der Herstellung von Virusvakzinen. Mh. Tierheilkde. 10, 161 (1958)
89. WITTMANN, G. und A. MAYR: Zur Pathogenese der Hühnerpockeninfektion. II. Teil: Die Pathogenese der Hühnerpockeninfektion des bebrüteten Hühnereies und die ihr zugrundeliegenden Virusbewegungen in den embryonalen und außerembryonalen Organen bei verschiedenen Stämmen. Mh. Tierheilkde 9, 6 (1957)
90. WOERNLE, H. : Diagnose der infektiösen Bronchitis der Hühner mit Hilfe der Präzipitationsreaktion im festen Agarmedium. Mh. Tierheilkde 11, 154 (1959)
91. WOERNLE, H. : Erfahrungen mit der Präzipitationsreaktion im festen Agarmedium bei der Diagnose von Viruskrankheiten. Mh. Tierheilkde 13, 111 (1961)
92. WOODROOFE, G. M. and E. W. GOODPASTURE (1931)
 - zit. n. Röhrer (1967)
 - zit. n. Bierbaum und Weitzenberg (1939)

93. WOODROOFE, G.M. and F. FENNER: Serological relationships within the pox virus group: an antigen common to all members of the group. *Virology* 16, 334 (1962)

Herrn Professor Dr. G. Monreal danke ich herzlich für seine großzügige Unterstützung und sein ständiges Interesse an den durchgeführten Untersuchungen.

Ebenso gilt mein Dank Herrn Professor Dr. S. Grund und seinen Mitarbeitern für die gewährte Zusammenarbeit bei den elektronenmikroskopischen Untersuchungen.

Fräulein G. Beyer und Frau T. Klessinger danke ich für ihre technische Hilfe.

LEBENS LAUF

Am 5. Mai 1941 wurde ich als zweiter Sohn des Arztes Dr. Gerhard Kraft und seiner Ehefrau Frieda Kraft, geborene Wickel, in Berlin geboren.

1947 wurde ich in Stahnsdorf/Bezirk Potsdam eingeschult und legte 1962 am Luise-Henriette-Gymnasium in Berlin-Tempelhof die Reifeprüfung ab.

Im Sommersemester 1962 begann ich an der Freien Universität Berlin mit dem Studium der Volkswirtschaft, das ich aber nach drei Semestern aufgab, um Veterinärmedizin zu studieren.

Das tierärztliche Studium an der Freien Universität Berlin begann ich im Wintersemester 1963/64, legte im April 1965 das Vorphysikum, im September 1966 das Physikum ab und beendete im November 1969 das Studium mit dem Staatsexamen. Die Bestallung als Tierarzt erhielt ich am 24. November 1969.

Seit Dezember 1969 bin ich am Institut für Geflügelkrankheiten des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin als wissenschaftlicher Assistent tätig.

LEBENSLEISTEN

Am 5. Mai 1911 wurde ich als zweites Kind des Arztes
Dr. Gerhard Kohn und seiner Ehefrau Frieda Kohn, geborene
von Wichel, in Berlin geboren.

1927 wurde ich in Kaiser-Wilhelm-Berlin geboren
und legte 1937 am Kaiser-Wilhelm-Institut in Berlin
Tropische und Bakteriologie ab.

Im Sommersemester 1938 wurde ich an der Freien Uni-
versität Berlin mit dem Thema der Infektionskrankheiten
abschließend promoviert und zum Vize-Doktor
ernannt.

Das Gesundheitswesen studierte ich an der Freien Universität
in Berlin im Wintersemester 1938/39, legte im April
1939 das Vize-Doktorat ab, im September 1939 das
und beendete im Sommer 1939 das Studium mit dem
examen. Die Dissertation über Infektionskrankheiten
wurde 1939.

Im Dezember 1939 bin ich zum Institut für Infektions-
krankheiten des Kaiser-Wilhelm-Instituts für Medizin
nach Berlin als wissenschaftlicher Assistent
berufen.

